

Université de Sherbrooke

**DÉTERMINATION DES RÔLES DU DOMAINE EXTRACELLULAIRE DE
CA125 (MUC16) DANS LE CANCER DE L'OVAIRE**

par

Martine Migneault

Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie

Février 2008

Évaluateurs :

Dre Claudine Rancourt, Département de Microbiologie et Infectiologie

Dr Brendan Bell, Département de Microbiologie et Infectiologie

Dre Nathalie Perreault, Département de Biologie cellulaire



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-37909-7

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-37909-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	II
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	IX
Liste des sigles et abréviations.....	X
Résumé	
INTRODUCTION.....	1
1. Cancer de l'épithélium de l'ovaire.....	1
1.1 Types histologiques de cancers épithéliaux de l'ovaire.....	4
1.2 Biomarqueurs du cancer de l'ovaire.....	6
1.3 Microenvironnement des cellules cancéreuses de l'ovaire.....	7
1.4 Cellules mésothéliales et mésothéline.....	8
2. Le cancer.....	10
2.1 Propriétés des cellules cancéreuses.....	10
2.2 Tumorigénicité.....	10
2.2.1 Prolifération cellulaire.....	10
2.2.2 Adhésion cellule-cellule et prolifération en absence d'ancrage.....	11
2.3 Potentiel métastatique.....	12
2.3.1 Migration et invasion.....	12
3. Les mucines.....	14
3.1 Structure générale des mucines.....	15
3.2 Rôles des mucines.....	17
3.2.1 Évasion du système immunitaire des cellules cancéreuses à l'aide des mucines	18

4.	CA125.....	19
4.1	Historique.....	19
4.2	Importance clinique de CA125.....	19
4.3	Le gène de CA125.....	21
4.4	Structure protéique de CA125.....	23
4.5	Expression et propriétés et de la protéine CA125.....	27
4.6	Rôles connus de CA125.....	28
4.7	Modèles d'étude de CA125 établis antérieurement dans le laboratoire.....	29
4.7.1	Modèle perte de fonction (knockdown).....	29
4.7.2	Modèle gain de fonction	30
4.7.3	Phénotypes observés et rôles attribués à CA125 déterminés à l'aide des modèles d'étude.....	32
5.	Hypothèse et objectifs	34
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		36
6.	Culture cellulaire.....	36
7.	Western blot overlay.....	38
8.	Cytométrie de flux – liaison mésothéline/CA125.....	39
9.	Isolation de cellules NK à partir de sang frais.....	39
10.	Cytométrie de flux – détermination de la présence de CA125 à la surface des Lc	39
11.	Essai de cytotoxicité.....	40
12.	Descriptions des plasmides.....	40
13.	Construction de la cassette d'expression.....	43
13.1	Production d'adaptateurs.....	43
13.2	Clonage.....	43
13.3	Transformation des bactéries XL1 par choc thermique.....	45
13.4	Réaction de PCR.....	46
13.5	Ligation et transformation par choc thermique.....	49
14.	Transfert des cassettes d'expression dans pLenti6/V5.....	50

14.1	Transformation des bactéries STBL3 par électroporation.....	51
15.	Production des lentivirus.....	52
16.	Infection des cellules par les lentivirus et sélection des cellules transduites.....	53
17.	Isolation d'ARN.....	54
18.	RT-PCR.....	55
19.	Récolte de milieu conditionné.....	55
20.	Dosage biochimique de CA125 dans le milieu de culture conditionné.....	56
21.	Lyse cellulaire.....	56
22.	Purification des protéines recombinantes poly-His par colonne de nickel.....	57
23.	Immunoprécipitation.....	58
24.	Gel SDS-PAGE et immunobuvardage de type western.....	59
25.	Immunofluorescence indirecte sur lame.....	60
26.	Formation de colonies en milieu semi-solide (sans ancrage).....	62
27.	Formation de foyers post-confluence.....	63
28.	Courbes de croissance.....	63
29.	Formation de sphéroïdes par goutte inversée.....	64
30.	Clonogénicité sur plastique.....	64
31.	Essai de migration par blessure de la monocouche.....	65
RÉSULTATS.....		66
32.	Détermination de la présence de CA125 à la surface des lymphocytes.....	66
33.	Expression de CA125 par les lymphocytes ayant été en présence de CA125.....	68
34.	Sensibilité des cellules tumorales aux cellules NK.....	69
35.	Liaison CA125 / mésothéline.....	72
36.	Liaison mésothéline / cellules CA125-positives.....	73
37.	Expression de CA125 par les cellules mésothéliales.....	74
38.	Interaction hétérotypique cellules mésothéliales / cellules CA125-positives.....	75
39.	Construction des plasmides pour l'expression et la sécrétion des domaines extracellulaires de CA125.....	77
40.	Production de lentivirus et infection des cellules humaines.....	79

41.	Validation de l'expression des protéines recombinantes et de la fonctionnalité des étiquettes.....	81
42.	Constructions des plasmides pour l'expression membranaire des domaines extracellulaires de CA125.....	84
43.	Production des lentivirus et infection des cellules humaines.....	84
44.	Validation de l'expression des protéines recombinantes membranaires et de la fonctionnalité des étiquettes.....	85
45.	Localisation cellulaire des protéines recombinantes MUC16-UTM et MUC16-1RUTM.....	87
46.	Comparaison des profils de croissance des populations stables.....	89
47.	Formation de foyers post-confluence.....	90
48.	Essai de clonogénicité sur plastique.....	93
49.	Interaction cellule-cellule et croissance en absence d'ancrage.....	95
50.	Migration cellulaire.....	98
DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....		101
51.	Interaction des cellules CA125-positives ou de CA125 du milieu conditionné ou présent dans l'ascite avec son microenvironnement.....	102
51.1	CA125 interagit avec la surface des lymphocytes.....	102
51.2	Les cellules cancéreuses de l'ovaire exprimant CA125 se lient aux cellules mésothéliales via la mésothéline.....	106
52.	Construction et validation des populations stables sécrétant les domaines extracellulaires de CA125.....	108
53.	Construction et validation des populations stables exprimant les domaines extracellulaires de CA125 à la membrane.....	110
54.	Profils de croissance et clonogénicité sur plastique similaires entre les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM et les cellules contrôles.....	111
55.	Les cellules MUC16-UTM forment des agrégats cellulaires très serrés et croissent bien en absence d'ancrage.....	114

56.	Les cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM ont un potentiel migratoire élevé	118
57.	Comparaison des phénotypes des modèles d'études de CA125	119
58.	Modèle proposé.....	122
59.	Conclusions et perspectives	123
Remerciements.....		126
Références.....		128

LISTE DES FIGURES

1. Cavité intrapéritonéale et péritonéum.....	8
2. Métastase des cellules cancéreuses de l’ovaire.....	13
3. Étapes de la cascade métastatique et molécules impliquées.....	14
4. Classification des mucines et domaines retrouvés chez les mucines.....	16
5. Structure de CA125 proposée par le groupe de O’Brien.....	23
6. Représentation schématique d’une unité répétitive typique de CA125.....	25
7. Validation des clones knockdown de CA125.....	30
8. Validation de la population SKOV3-MUC16-CTD.....	31
9. Carte des plasmides.....	42
10. Schématisation de la cassette d’expression fabriquée.....	45
11. Détermination de la présence de CA125 à la surface de lymphocytes ayant été en présence de CA125.....	68
12. Expression de CA125 par les lymphocytes sains incubés dans l’ascite et les lymphocytes de patientes.....	69
13. Sensibilité des cellules CA125-knockdown à la lyse par les cellules NKL.....	71
14. Liaison des protéines CA125 native et mésothéline recombinante Méso-Fc.....	73

15. Liaison de la Méso-Fc aux cellules CA125-positives.....	74
16. Expression de CA125 par les cellules Méso-9.....	75
17. Formation de doublets de cellules CA125-positives / cellules Msn-positives.....	76
18. Schématisation des constructions et protéines recombinantes produites.....	78
19. Validation de l'expression des protéines recombinantes sécrétées.....	83
20. Validation de l'expression des protéines recombinantes membranaires (domaines extracellulaires de CA125)	86
21. Localisation cellulaire des protéines de fusion MUC16-UTM et -1RUTM.....	88
22. Courbe de croissance cellulaire des populations stables dérivées de la lignée SKOV3.....	90
23. Formation de foyers post-confluence.....	92
24. Nombre de colonies et nombre de cellules par colonies formées par essai de clonogénicité sur plastique.....	94
25. Formation de sphéroïdes et de colonies en agar mou par agrégation cellulaire.....	96
26. Essai de croissance en absence d'ancrage.....	97
27. Migration cellulaire par blessure de la monocouche de cellules.....	100
28. Mécanismes de cytotoxicité des cellules NK envers les cellules normales vs transformées	105

LISTE DES TABLEAUX

1. Description des différents stades de développement du cancer épithélial de l’ovaire.....	2
2. Classification des tumeurs malignes de l’ovaire.....	6
3. Phénotypes observés chez les modèles d’études de CA125 antérieurement dans le laboratoire.....	33
4. Conditions de PCR.....	48
5. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés et conditions d’utilisation.....	62
6. Comparaison des phénotypes observés chez les modèles d’études de CA125 du laboratoire.....	120

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AEBSF	4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
AMVRT	Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase
ARNase	Ribonucléase
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosyltriphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
CA125	Cancer Antigen 125
cm	Centimètre
CMV	Cytomégalovirus
CNBr	Bromure de cyanogène
CO ₂	Dioxyde de carbone
CTD	C-Terminal Domain
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF	Epithelial Growth Factor

EGF-R	Epithelial Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EV	Empty Vector
FBS	Fetal Bovine Serum
Fc	crystalizable fragment (partie d'un anticorps)
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique
FITC	Fluoresceine Iso Thio Cyanate
g	Gramme
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycophosphatidyl inositol
h	Heure
HE4	Human Epididymis Protein 4
HIV	Human immunodeficiency virus
IL-1	Interleukine-1
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KAR	Killing activating receptor
KDEL	Lysine-Aspartate-Glutamine-Leucine
KIR	Killing inhibitory receptor
L	Litre
LB	Luria Broth
Lc	Lymphocyte
LTR	Long Terminal Repeats

M	Molaire
mA	Milliampère
min	minute
mg	Milligramme
μg	Microgramme
mL	Millilitre
μL	Microlitre
mM	Millimolaire
MMP	Métalloprotéases
MmuIV	Moloney murine leukemia Virus
MPF	Megakaryocyte Potentiating Factor
MSN	Mésothéline
MUC	Mucine
Ni	Nickel
NK	Natural Killer
nmole	nanomole
pb	paire de base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
poly(A)	Polyribose A
poly-His	Poly-histidine
pt	Patients
PVDF	polyvinylidene difluoride
RE	Réticulum endoplasmique

RNF5	Ring finger protein 5
RPM	Rotation par minute
RRE	Rev Responsive Element
RSV	Respiratory syncytial virus
RT-PCR	Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
scFv	Single-chain Fragment variable
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate Poly-acrylamide gel electrophoresis
SEA	Sea urchin, Enterokinase, Agrin
sec	seconde
Ser	Sérine
SV40	Simian Virus 40
TGF- α	Transforming Growth Factor alpha
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
Thr	Thréonine
TM	Transmembranaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
U	Unités
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat

RÉSUMÉ

Le cancer ovarien est le cancer gynécologique le plus létal. L'antigène cancéreux 125 (CA125) est surexprimé dans 80% des cancers épithéliaux de l'ovaire et est le marqueur utilisé présentement pour le suivi des patientes. CA125 est exprimé par les cellules épithéliales cancéreuses de l'ovaire mais pas par les cellules épithéliales normales de l'ovaire. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type mucine. Les fonctions de ce marqueur demeurent inconnues jusqu'à ce jour. D'après les observations faites sur deux différents modèles d'étude de CA125 de notre laboratoire, nous proposons que le domaine extracellulaire de CA125 pourrait avoir des rôles dans la tumorigénicité et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses de l'ovaire.

L'objectif de ce projet est la détermination des fonctions du domaine extracellulaire de la mucine CA125 dans la tumorigénicité et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses de l'ovaire. Deux modèles ont été utilisés : un modèle de perte de fonction (clones stables CA125 knockdown) et un modèle de gain de fonction (populations stables exprimant les domaines extracellulaires de CA125). Avec les clones stables CA125-knockdown, les interactions hétérotypiques des cellules cancéreuses de l'ovaire dans leur microenvironnement ont été observées. Des expériences de cytométrie de flux ont montré que le CA125 isolé de milieu de culture des cellules OVCAR-3 (cellules CA125-positives) et d'ascite de patiente lie les lymphocytes. De plus, nous avons déterminé par un essai de cytotoxicité que les cellules exprimant CA125 étaient protégées de la lyse par les cellules NK comparativement aux cellules CA125-knockdown. L'interaction CA125 / mésothéline et cellules CA125-positives / cellules mésothéline-positives a également été montrée par différents essais de cytométrie de flux et immunobuvardage de type western. Le modèle de gain de fonction produit consiste en l'établissement de populations stables exprimant à la

membrane cellulaire le domaine unique (MUC16-UTM) et le domaine unique ajouté d'une répétition de CA125 (MUC16-1RUTM) dans la lignée cellulaire SKOV3 par un système d'expression lentiviral. Ces populations stables ont servi à montrer que le domaine unique de CA125 était suffisant pour conférer des phénotypes tumorigéniques aux cellules comparativement aux cellules contrôles. En effet, les populations stables MUC16-UTM forment des agrégats très serrés et croissent bien en absence d'ancrage. Les cellules MUC16-1RUTM sont quant à elles plus tumorigéniques que les contrôles, mais moins que les cellules MUC16-UTM. Les deux populations stables ont le même temps de doublement et la même clonogénicité que les cellules contrôles, mais ont une diminution de l'inhibition de contact comme l'ont révélé les courbes de croissance et la formation de foyers post-confluence. Un essai de migration par blessure de la monocouche a révélé que les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM ont également un potentiel migratoire plus important que les cellules contrôles. Ces cellules, en plus d'être plus tumorigéniques, ont aussi un potentiel métastatique plus élevé comparativement aux contrôles.

Ces résultats concordent avec des données observées avec un autre modèle de gain de fonction du laboratoire (MUC16-CTD), qui ont aussi été déterminées comme plus tumorigéniques et ayant un potentiel métastatique plus élevé que les cellules contrôles. Ce projet vient donc affirmer que le domaine extracellulaire de CA125 (en particulier le domaine unique) a des fonctions dans la tumorigénicité et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses de l'ovaire.

Mots clés : Cancer, ovaire, CA125, domaine extracellulaire, tumorigénicité, potentiel métastatique.

INTRODUCTION

1. Cancer épithélial de l'ovaire

Le cancer ovarien compte pour 5 % de tous les cas de cancers chez les femmes et une sur 55 sera atteinte du cancer de l'ovaire au cours de sa vie (WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003). Ce type de cancer est le cancer gynécologique le plus létal (OZOLS et al., 2004). Selon les estimations, 2400 canadiennes développeront un cancer ovarien tandis que 1700 en mourront durant l'année 2007 (SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER, 2007). L'incidence du cancer de l'ovaire est significativement plus basse que pour le cancer du sein par exemple, mais la survie après 5 ans est beaucoup plus faible. Le cancer de l'ovaire se trouve au cinquième rang du classement des cancers les plus létaux chez les femmes (SCHUMMER et al., 1999, WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003). Un tel taux de mortalité est principalement dû au fait qu'il y ait absence de signes et symptômes pour pouvoir poser un diagnostic durant les phases les plus précoces de la maladie ainsi que l'absence de test diagnostic sensible et spécifique (SCHUMMER et al., 1999). Le pronostic serait grandement amélioré si le diagnostic pouvait être fait de façon plus précoce. En effet, lorsque le diagnostic est possible durant les stades I et II de la maladie (stades déterminés par la Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique (FIGO), voir la description des stades au tableau 1), la survie après 5 ans est de 90% et 70% respectivement, tandis que durant les stades III et IV, elle diminue à moins de 20% (WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003).

Tableau 1 : Description des différents stades de développement du cancer épithélial de l'ovaire selon la Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique (FIGO) (adapté de MARTIN, 2002)

<i>Stade</i>	<i>Description</i>
Stade I	Croissance tumorale limitée aux ovaires
Stade IA	1 ovaire, sans ascite, sans tumeur à la surface externe, capsule intacte
Stade IB	2 ovaires, sans ascite, sans tumeur aux surfaces externes, capsules intactes
Stade IC	Comme stade IA ou IB mais avec présence à la surface d'une tumeur à 1 ou aux 2 ovaires, capsule rompues, présence d'ascite contenant des cellules malignes, ou lavages péritonéal positif
Stade II	Croissance tumorale impliquant 1 ou 2 ovaires, avec extension pelvienne
Stade IIA	Extension ou métastases à l'utérus ou aux trompes de Fallope
Stade IIB	Croissance impliquant 1 ou 2 ovaires, avec extension pelvienne
Stade IIC	Comme stade IIA ou IIB mais avec présence à la surface d'une tumeur à 1 ou aux 2 ovaires, capsule rompue, présence d'ascite contenant des cellules malignes, ou lavage péritonéal positif
Stade III	Tumeur impliquant 1 ou 2 ovaires avec implants péritonéaux hors de la région pelvienne, métastases superficielles au foie, tumeur limitée à la région pelvienne réelle mais avec des extensions vérifiées histologiquement comme malignes au petit intestin
Stade IIIA	Tumeur grossièrement limitée à la région pelvienne et ganglions négatifs mais avec surfaces péritonéales abdominales confirmées histologiquement comme malignes
Stade IIIB	Tumeur de 1 ou 2 ovaires avec implants aux surfaces péritonéales abdominales confirmées histologiquement n'excédant pas 2 cm de diamètre, ganglions négatifs
Stade IIIC	Implants abdominaux excédant 2 cm de diamètre ou ganglions positifs
Stade IV	Croissance impliquant 1 ou 2 ovaires avec métastases distantes. Si effusion pleurale, résultat de test cytologique positif requis pour déclarer le cas comme stade IV. Métastases parenchymateuses au foie.

L'âge avancé auquel les femmes atteintes de cancer ovarien sont diagnostiquées (63 ans en moyenne) contribue également à la forte mortalité associée à cette maladie (OZOLS et al., 2004). Parmi les facteurs de risques contribuant au développement du cancer épithélial de

l'ovaire, on note la nulliparité, l'hyperovulation (traitement de l'infertilité), des mutations au niveau des gènes BRCA1 et BRCA2 (OZOLS et al., 2004, AUESPERG et al., 2001). On doit cependant apporter un bémol au sujet des traitements de l'infertilité : différentes études spécifiques à la relation entre l'infertilité et le cancer ovarien ont montré que les causes biologiques de l'infertilité ont un rôle à jouer dans les risques de cancer ovarien contrairement aux drogues contre l'infertilité. Par exemple, parmi ces causes, l'endométriose élèverait les risques de façon significative (PARAZZINI et al., 1997, NESS et al., 2002). D'autres facteurs protègent contre l'apparition de cancer de l'ovaire : les contraceptifs oraux, la grossesse, l'hystérectomie et la ligature des trompes de Fallope. Ces observations sont supportées par l'une des deux hypothèses de l'étiologie du cancer de l'ovaire, l'hypothèse de Fathalla, proposée en 1971 (FATHALLA, 1971) et ensuite démontrée par des données expérimentales et épidémiologiques (AUESPERG et al., 1998). Selon cette hypothèse, l'ovulation fréquente contribuerait à augmenter le risque de développement de cancer à cause de la rupture et la réparation de l'épithélium de l'ovaire aux sites de l'ovulation et donnerait ainsi plus d'opportunités aux aberrations génétiques de se produire. La ligature des trompes de Fallope et l'hystérectomie semblent également protéger contre le développement de cancer épithélial de l'ovaire. Il a été récemment suggéré que ces deux méthodes préviendraient le passage d'initiateurs de l'inflammation, elle-même proposée comme facteur contribuant au développement de cancer (NESS et COTTREAU, 1999). La seconde hypothèse de l'étiologie du cancer de l'ovaire est celle des gonadotropines (CRAMER et WELCH, 1983) et inclut le facteur inflammation. Cette hypothèse veut que les gonadotropines qui initient chaque ovulation et qui persistent à de hauts niveaux même après la ménopause stimulent les cellules épithéliales de l'ovaire et induisent des transformations. L'inflammation a été suggérée

comme étant le mécanisme par lequel la stimulation des gonadotropines et l'ovulation contribueraient aux risques de cancer ovarien.

Outre les facteurs de risques mentionnés, des facteurs génétiques peuvent augmenter le risque de développer un cancer de l'ovaire. En effet, l'historique familial de cancer de sein et/ou de l'ovaire est important à considérer. Les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2, codant pour des protéines régulant la réponse aux dommages à l'ADN, sont les principales responsables des cas de cancers de l'ovaire et de sein familiaux. Les mutations somatiques de ces gènes sont rares mais des changements épigénétiques de la méthylation du promoteur de BRCA1 résultant en une inhibition transcriptionnelle du gène a été démontrée dans 5 à 10% des cas de cancers ovariens non-familiaux (OZOLS et al., 2004). Les mutations germinales de BRCA1 sont responsables de 80% des cas de cancer du sein et de l'ovaire familiaux. Plusieurs oncogènes sont souvent surexprimés ou amplifiés dans les cas de cancers ovariens. Parmi eux, notons cMYC, KRAS, ERBB2, EGF-R, cFMS, tous associés à un mauvais pronostic (TASHIRO et al., 1992; ENOMOTO et al., 1991; BERCHUCK et al., 1990; KOHLER et al., 1989; KACINSKI et al., 1989). Certains effecteurs de voies de survie tels que PI3K et AKT2 sont amplifiés dans une proportion significative de cancers ovariens (SHAYESTEH et al., 1999; BELLACOSA et al., 1995). Parmi les suppresseurs de tumeurs, p53 et PTEN peuvent être mutés (BERCHUCK et al., 1994, OBATA et al., 1998).

1.1 Types histologiques de cancers épithéliaux de l'ovaire

Durant la transformation néoplasique de l'épithélium de l'ovaire se produisent des changements dans la différenciation des cellules. L'épithélium primitif de l'ovaire possède

plutôt des caractéristiques stromales, mais au fur et à mesure qu'il progresse vers la malignité, il acquiert des caractéristiques de l'épithélium du conduit Mullerien, de l'endomètre et du col utérin. Ce type de différenciation sert de base pour la classification des types histopathologiques de cancers ovariens épithéliaux. Environ 80% des cancers de l'épithélium de l'ovaire sont de type séreux (différenciation semblable aux trompes de Fallope). Les différents types de cancer de l'ovaire peuvent être classés selon le type cellulaire duquel ils proviennent (tableau 2). Les tumeurs séreuses sont généralement positives pour le marqueur de cancer ovarien CA125 (OZOLS, 2003). Parmi les autres types histologiques, on retrouve les tumeurs endométrioïdes (semblables à l'endomètre) et mucineuses (semblables au col utérin) (AUESPERG et al., 2001).

Tableau 2 : Classification des tumeurs malignes de l’ovaire. (adapté de WILLIAMS et al., 2007)

1. Tumeurs épithéliales communes
 - A. Tumeurs séreuses
 - B. Tumeurs mucineuses
 - C. Tumeurs endométrioides
 - D. Carcinome des cellules claires
 - E. Tumeurs de Brenner
 - F. Tumeurs épithéliales mélangées
 - G. Carcinomes non-différentiés
 - H. Tumeurs non-classifiées
2. Cancers spécialisés des cellules stromales
 - A. Tumeurs des cellules de la granulosa
 - B. Tumeurs des cellules de Theca
 - C. Tumeurs des cellules de Sertoli-Leydig
 - D. Tumeurs des cellules de Hilar
3. Tumeurs des cellules germinales
 - A. Teratomes
 - B. Teratomes matures
 - C. Teratomes immatures
 - D. Struma ovarii
 - E. Carcinoïdes
 - F. Dysgerminomes
 - G. Carcinome des cellules embryonnaires
 - H. Tumeurs des sinus endodermal
 - I. Choriocarcinomes primaires
 - J. Gonadoblastomes
4. Tumeurs des tissus mous non-spécifiques à l’ovaire
5. Tumeurs non-classifiées
6. Tumeurs secondaires (métastatiques)
7. Conditions tumeur-like

1.2 Biomarqueurs du cancer de l’ovaire

Un biomarqueur est défini comme une caractéristique quantifiable d’un état biologique normal ou pathologique ou dû à une réponse pharmacologique à un traitement de la maladie.

Un bon marqueur pour application clinique doit rapidement refléter les changements de taille et de la biologie de la tumeur (MARTH et al., 1998). Il existe deux types principaux de biomarqueurs : les biomarqueurs pronostiques et diagnostiques. La kallikréine, la matriptase et la sérotransferrine sont des exemples de marqueurs pronostiques du cancer épithélial de l'ovaire (BORGONO et al., 2006; OBERST et al., 2002; AHMED et al., 2005). Parmi les marqueurs diagnostiques du cancer épithélial de l'ovaire, des exemples pourraient être la mésothéline, CA125 et HE4 (HASSAN et al., 2006; SCHOLLER et al., 2006; BAST et al., 1983). CA125 est le principal marqueur utilisé jusqu'à maintenant et il est classé parmi les marqueurs diagnostiques car il est efficace chez les patientes à hauts risques, comme les cas d'histoires génétiques de la maladie (WILLIAMS et al., 2007). Hormis ces exemples, on dira alors que CA125 est davantage un outil pour le suivi des patientes qu'un marqueur diagnostique de cancer ovarien.

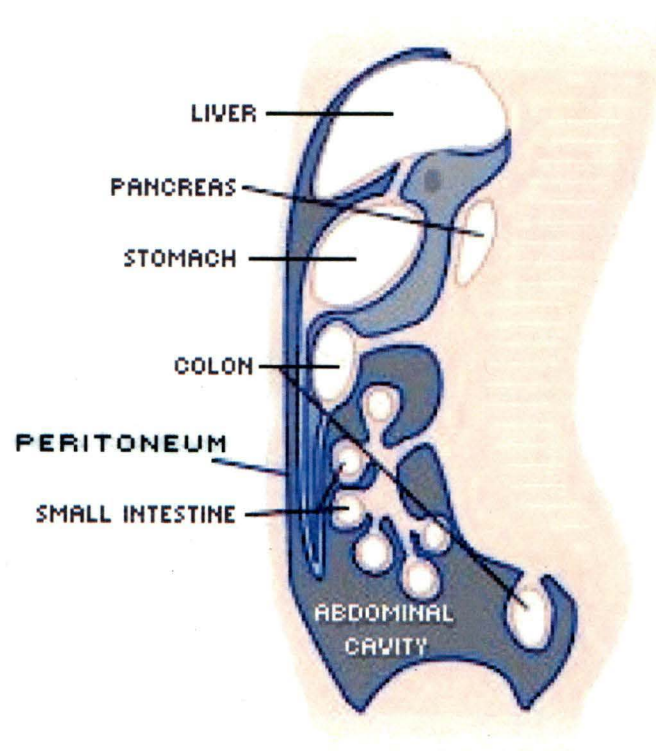
1.3 Microenvironnement des cellules cancéreuses de l'ovaire

Le microenvironnement des cellules cancéreuses de l'ovaire se compose des cellules mésothéliales qui tapissent la cavité intrapéritonéale (voir figure 1), des composantes de la matrice extracellulaire, de cellules inflammatoires et immunitaires, de cytokines et molécules inflammatoires et d'ascite, un liquide provenant des vaisseaux sanguins hyperperméables (SAID et al., 2007). Dans les stades avancés de cancer ovarien, l'ascite maligne contenant des cellules tumorales détachées de l'épithélium de l'ovaire s'accumule dans la cavité péritonéale et forment des sphéroïdes (agrégats multicellulaires) ou demeurent à l'état de cellules individuelles (BURLESON et al., 2004). Ces cellules peuvent survivre et proliférer dans cet environnement qui ne leur permet pas un accès direct aux vaisseaux sanguins pour les

approvisionner en nutriments et facteurs de survie. Subséquemment, ces cellules tumorales pourront toutefois s'attacher aux parois de la cavité intrapéritonéale, migrer, former des métastases et aller s'implanter à des foyers secondaires.

Figure 1 : Cavité intrapéritonéale et péritonéum.

Représentation schématique d'une coupe transversale de l'abdomen montrant le péritonéum (en bleu). (tiré de : <http://www.cancer-mesothelioma-information.com>)



1.4 Cellules mésothéliales et mésothéline

Le mésothélium est une monocouche de cellules mésothéliales plates qui couvre la cavité intrapéritonéale (voir figure 1). Il joue un rôle très important dans la propagation des cellules

cancéreuses de l'ovaire à des sites secondaires par ses fonctions dans l'attachement des cellules, leur implantation et leur croissance (RIEPPI et al., 1999). Les cellules mésothéliales expriment plusieurs protéines de matrice extracellulaire et de molécules d'adhésion (intégrines et CD44, par exemple), molécules favorisant l'adhésion des cellules cancéreuses de l'ovaire (BURLESON et al., 2004). La mésothéline est une glycoprotéine de 40 kDa exprimée très fortement par le mésothélium et par les cellules cancéreuses de l'ovaire (CHANG et PASTAN, 1996). Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 70 kDa (HASSAN et al., 2004) et un clivage protéolytique permet la relâche d'un fragment de 32 kDa, le Megakaryocyte Potentiating Factor (MPF) (YAMAGUCHI et al., 1996). L'autre fragment, de 40 kDa, provenant du précurseur est ancré à la surface cellulaire via un lien glycophosphatidyl inositol (ancre GPI); il s'agit de la mésothéline (CHANG et PASTAN, 1996). Certaines études ont suggéré un rôle d'adhésion cellulaire de la mésothéline (CHANG et PASTAN, 1996). Par exemple, l'adhésion cellulaire hétérotypique entre des cellules épithéliales cancéreuses de l'ovaire (la lignée cellulaire OVCAR-3) et des cellules endothéliales de souris dérivées de la région aorte-gonades-mesonéphron d'un embryon de souris (lignée cellulaire LO) a été montrée (RUMP et al., 2004). De plus, dans cette étude, l'addition d'anticorps anti-mésothéline fait diminuer la liaison entre les deux lignées cellulaires.

2. Le cancer

2.1 Propriétés des cellules cancéreuses

Une tumeur maligne, ou cancer, est le résultat d'une transformation d'une cellule normale qui proliférera anormalement dans un environnement normal (VOET et VOET, 1998). Cette transformation est souvent due à une accumulation de modifications génétiques. Plusieurs caractéristiques sont communes aux cellules cancéreuses : elles sont auto-suffisantes en signaux de croissance, elles sont insensibles aux signaux d'inhibition de croissance, elles possèdent des moyens de s'évader de la mort cellulaire programmée (apoptose), elles ont un potentiel réplicatif illimité, elles favorisent l'angiogénèse et elles permettent l'invasion des tissus et les métastases (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000).

On peut diviser les phénotypes associés aux cellules tumorales en deux grandes catégories : les phénotypes associés au potentiel tumorigénique et ceux associés au potentiel métastatique.

2.2 Tumorigénicité

2.2.1 Prolifération cellulaire

En effet, les cellules cancéreuses démontrent des anomalies dans les mécanismes qui régulent les processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et la survie. Une première caractéristique des cellules cancéreuses associée à leur potentiel tumorigénique est la prolifération incontrôlée. En culture cellulaire, des cellules normales prolifèrent jusqu'à

l'atteinte d'une densité de cellules définie en partie par la quantité de facteurs de croissance présents dans le milieu de culture. Les cellules cessent alors de proliférer et entrent dans une phase de quiescence (phase G_0 du cycle cellulaire) (COOPER, 2000). Les cellules cancéreuses, quant à elles, ne sont plus sensibles et ne répondent plus à cette inhibition dépendante de la densité de cellules car elles produisent elles-mêmes leur propres facteurs de croissance. Elles se divisent donc de façon incontrôlée jusqu'à atteindre une très grande densité de cellules. Il est même possible d'observer en culture cellulaire l'apparition de foyers post-confluence, c'est-à-dire des amas de cellules qui ne possèdent plus aucune inhibition de contact et qui s'empilent les unes sur les autres. Lorsqu'une cellule normale devient mature, elle acquiert des fonctions associées à son type cellulaire et perd ses capacités à se diviser. Dans le cas d'une cellule cancéreuse, on dira qu'elle est dédifférenciée et qu'elle continue donc à se diviser de façon incontrôlée (DEVITA et al., 1997; NOWELL, 1986).

2.2.2 Adhésion cellule-cellule et prolifération en absence d'ancrage

Les cellules cancéreuses sont régulées beaucoup moins strictement par les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire que les cellules normales. De cette manière, les cellules cancéreuses sont aptes à survivre même en absence d'interactions avec d'autres cellules ou en absence d'ancrage à une matrice. En effet, elles sont moins adhésives en raison de la perte de molécules d'adhésion à leur surface (E-cadhérine, par exemple) (COOPER, 2000). Cette caractéristique des cellules cancéreuses aura un effet sur leur potentiel métastatique discuté un peu plus loin. Dans le cas du cancer épithélial de l'ovaire, des cellules tumorales sont relâchées par la surface de l'ovaire et se retrouvent dans l'ascite de la cavité péritonéale. Ces cellules ou agrégats de cellules (sphéroïdes) sont généralement considérés

comme anti-adhésifs mais s'implanteront éventuellement dans des sites secondaires dans la cavité péritonéale en formant des interactions cellule-cellule hétérotypiques (BURLESON et al., 2004).

2.3 Potentiel métastatique

2.3.1 Migration et invasion

D'autres caractéristiques des cellules cancéreuses réfèrent plutôt à leur potentiel métastatique. La cascade métastatique fait référence aux étapes que la cellule cancéreuse subira afin d'aller s'implanter à un site secondaire distant du site d'origine (Figure 2). Ces étapes sont : la dissémination des cellules tumorales par migration, la protéolyse, l'invasion, la croissance tumorale dans le site métastatique et l'angiogénèse (RUIZ et GÜNTHERT, 1996). Chez les cellules normales, l'invasion de cellules dans un tissu peut se produire lors de différents événements comme l'embryogénèse, la morphogénèse et la réparation de tissus. Ce processus est très régulé contrairement à l'invasion des cellules cancéreuses métastatiques. Les cellules épithéliales sont initialement ancrées à la lame basale leur transmettant des signaux de survie. Afin d'envahir d'autres tissus, les cellules tumorales malignes doivent migrer vers la lame basale vasculaire et dégrader la matrice extracellulaire pour pouvoir traverser la couche de cellules endothéliales. La dégradation de la matrice se fait à l'aide d'enzymes, les métalloprotéinases (MMP). La balance entre protéases et leurs inhibiteurs régule la digestion de la matrice extracellulaire. Une fois la couche de cellules endothéliales traversée, les cellules tumorales métastatiques circulent dans le sang et iront se réimplanter à un site secondaire. Un processus d'attachement et détachement des cellules pour leur migration

accompagne la protéolyse afin que les cellules acquièrent une motilité. Cependant, dans le cas du cancer ovarien, les métastases n'utilisent pas les vaisseaux sanguins ou lymphatiques pour se propager aux sites secondaires, mais se détachent de la tumeur primaire à la surface de l'ovaire et se retrouvent dans le liquide de la cavité péritonéale qui subit des mouvements provoqués par le diaphragme lors de la respiration (BROWN et al., 2000). Dans les cas de cancers ovariens, ce sont surtout les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 qui sont responsables de l'invasion (Brown et al., 2000). Aux sites secondaires, l'angiogénèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins devient alors essentielle pour assurer l'apport de nutriments et la relâche des déchets métaboliques produits par la nouvelle tumeur (Figure 3; BROWN et al., 2000).

Figure 2 : Métastase des cellules cancéreuses de l'ovaire.

Les cellules tumorales de l'ovaire se détachent du site primaire, voyagent dans la cavité intrapéritonéale et s'implantent à divers endroits comme aux ganglions lymphatiques et sur divers organes. (tiré de : <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/9627.htm>)

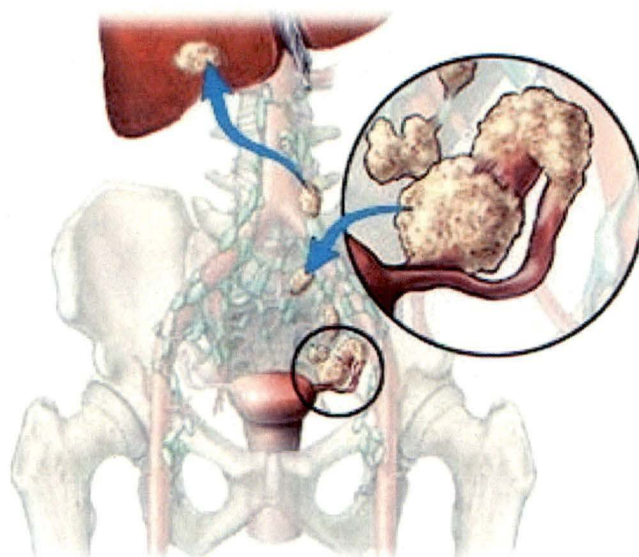
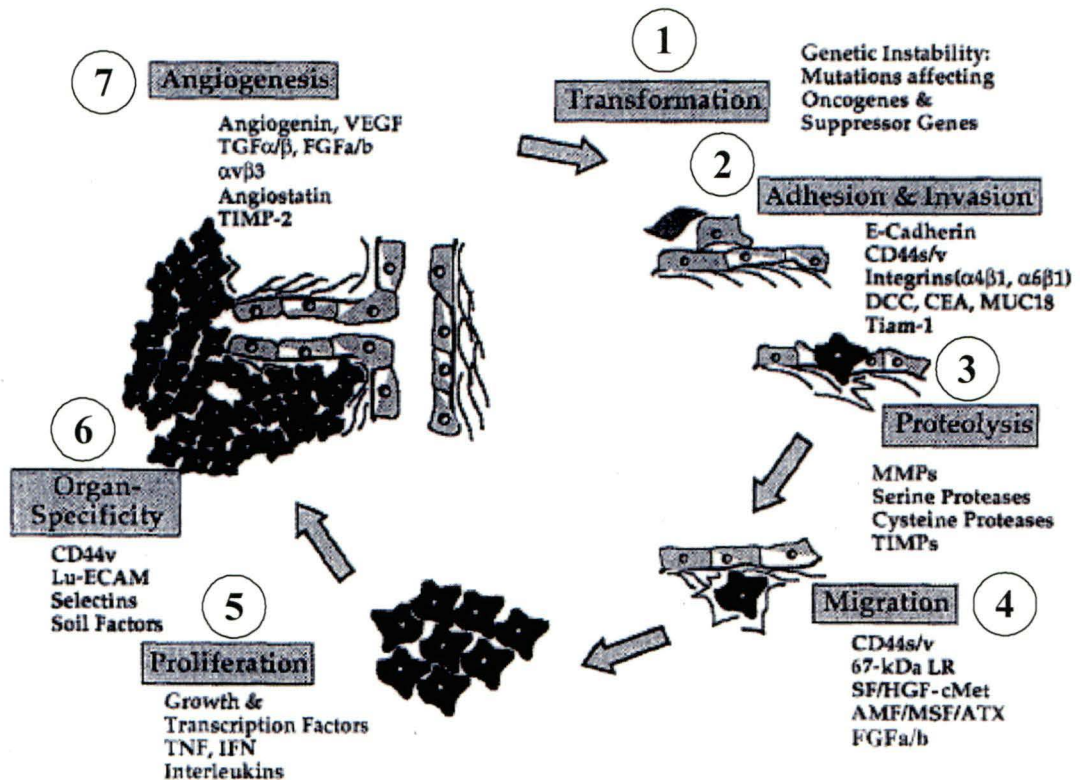


Figure 3 : Étapes de la cascade métastatique et molécules impliquées.

Une cellule subit d'abord une ou une accumulation de transformations (1). Il y a alors une augmentation ou une diminution de l'expression de certaines molécules de surface. Il y a donc une variation dans son adhésion et elle peut alors se détacher et envahir les tissus (2). L'expression de protéases et de leurs inhibiteurs change aussi et il y a alors protéolyse de la matrice extracellulaire (3) permettant ainsi à la cellule de migrer grâce à l'expression de facteurs impliqués dans la motilité (4). Différents facteurs de croissance permettent la prolifération des cellules cancéreuses (5) au nouveau site dans le nouveau microenvironnement (6). L'angiogénèse est finalement provoquée par l'expression de molécules la favorisant (7). (adapté de : RUIZ et GÜNTHER, 1996)



3. Les mucines

Le terme mucine est utilisé pour représenter les membres de la famille des grandes glycoprotéines composant majoritairement le mucus (ANDRIANIFAHANANA et al., 2006).

Il existe 19 mucines humaines à ce jour : MUC1, -2, -3A, -3B, -4, -5AC, -5B, -6, -7, -8, -9, -11, -12, -13, -15, -16, 17, -19 et -20. En conditions physiologiques normales, l'expression des mucines est spécifique au tissu, au stade de développement et au temps. L'expression dérégulée des mucines est une caractéristique importante de certains types de cancers (ANDRIANIFAHANANA et al., 2006).

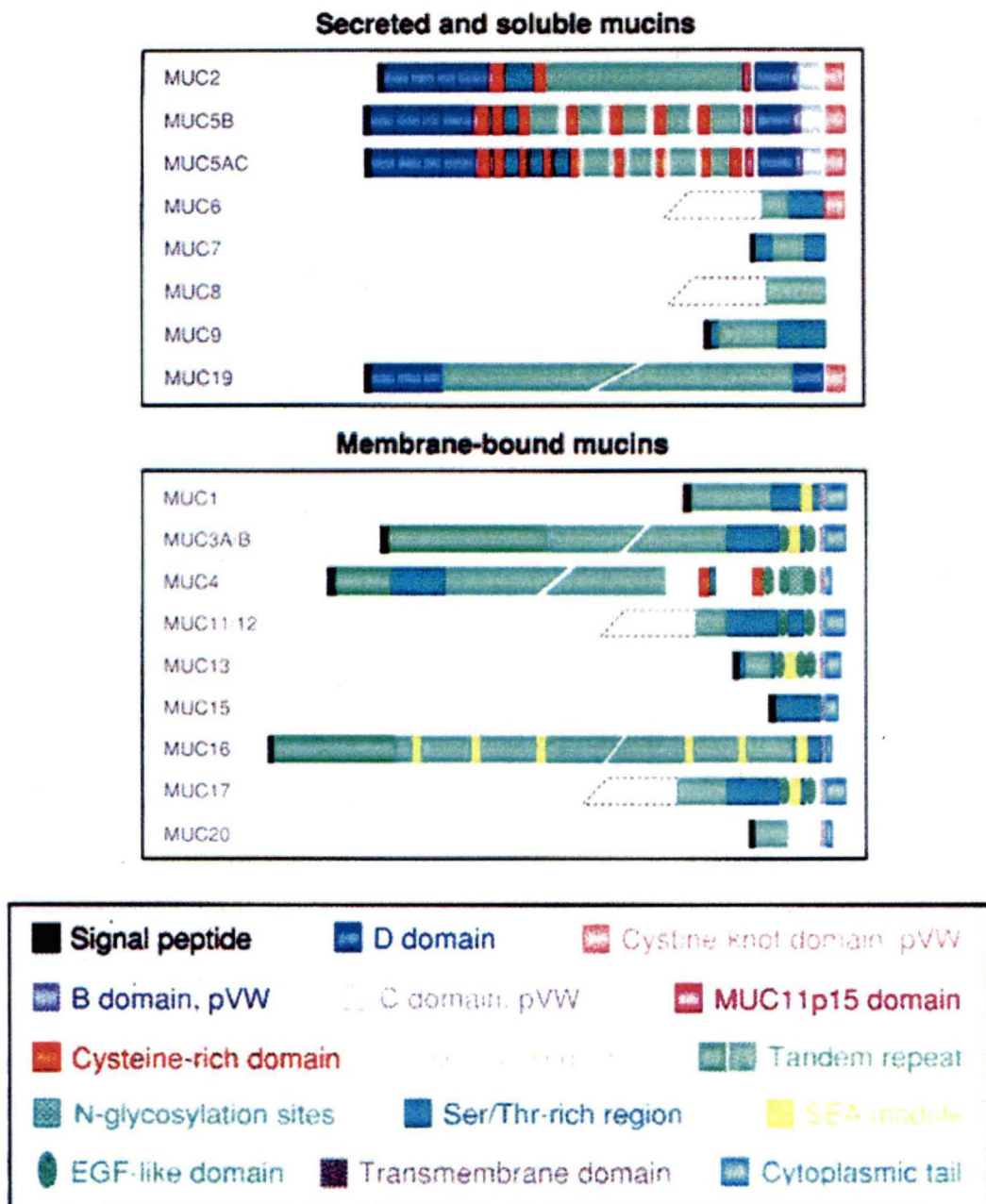
3.1 Structure générale des mucines

La structure de base des mucines consiste d'abord en un cœur protéique appelé apomucine. À celui-ci est associé un grand nombre d'oligosaccharides liés à -O et quelques-uns liés à -N. D'autres modifications post-traductionnelles telles que la sialylation ou la sulfatation sont observées fréquemment chez les mucines matures (ANDRIANIFAHANANA et al., 2006). Les mucines sont caractérisées par des motifs de répétitions en tandem positionnés dans le domaine extracellulaire au centre de la molécule. Les mucines montrent souvent un polymorphisme de type « nombre variable de répétitions en tandem » (VNTR) chez un même individu et aussi entre les individus. Ces répétitions sont riches en Ser et Thr, sites potentiels pour des O-glycosylations (ANDRIANIFAHANANA et al., 2006, DURAISAMY et al., 2006). Les sucres associés aux mucines comptent pour plus de 80% de la masse totale de la molécule (ANDRIANIFAHANANA et al., 2006).

Il existe 2 différentes classes de mucines : les mucines sécrétées (classe elle-même divisée en deux, soit formant un gel et ne formant pas de gel) et les mucines associées à la membrane. La différence entre les deux classes est que les mucines associées à la membrane possèdent un domaine transmembranaire, contrairement aux mucines sécrétées

(ANDRIANIFAHANANA et al., 2006). Les mucines membranaires possèdent également de façon caractéristique un domaine localisé entre les répétitions en tandem et le domaine transmembranaire, le domaine SEA (DURASAMY et al., 2006). Il s'agirait d'un site de clivage protéolytique.

Figure 4 : Classification des mucines et domaines retrouvés par les mucines. (adapté de ANDRIANIFAHANANA et al., 2006)



3.2 Rôles des mucines

L'environnement des cellules épithéliales exprimant les mucines explique en grande partie leurs rôles. En effet, cet environnement est sujet à de grandes fluctuations tant au niveau du pH, de la force ionique, de l'hydratation et l'oxygénation qu'à son exposition aux protéases, glycosidases, lipases et toxines. Le rôle central des mucines dans cet environnement est donc de maintenir l'homéostasie et de promouvoir la survie des cellules épithéliales dans ces conditions (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Les mucines peuvent servir de lubrifiant (mucus), récepteurs et senseurs à la surface cellulaire et conduire à des signaux répondant à des stimuli externes et mener à des effets cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la sécrétion de produits cellulaires spécialisés (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004, ANDRIANIFAHANANA et al., 2006).

Chez les cellules cancéreuses, les mucines montrent fréquemment une expression dérégulée et les glycosylations associées à ces mucines sont souvent aberrantes. L'expression ectopique et la surexpression des mucines membranaires chez les cellules tumorales est généralement associée à une augmentation du potentiel malin et à un mauvais pronostic (ANDRIANIFAHANANA et al., 2006). Les mucines permettent l'évasion du système immunitaire, l'induction de la transformation cellulaire, l'inhibition de l'apoptose induite par le stress et la signalisation cellulaire (ANDRIANIFAHANANA et al., 2006). Les mucines contribueraient aussi à l'invasion des tumeurs en brisant les interactions entre les cellules tumorales (propriété anti-adhésive) et en établissant des interactions avec de nouveaux ligands entre les cellules en invasion (cellules tumorales) et les cellules avoisinantes (propriété adhésive) (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004).

3.2.1 Évasion du système immunitaire des cellules cancéreuses à l'aide des mucines

Les cellules cancéreuses, même dans leur propre environnement, peuvent être reconnues comme étrangères par le système immunitaire. Pour survivre, se diviser et propager le cancer, ces cellules doivent échapper à cette défense de l'organisme. Les cellules cancéreuses expriment souvent des mucines à leur surface (MUC1 à la surface des cellules cancéreuses de sein, par exemple). Ces mucines ont un rôle à jouer dans l'évasion du système immunitaire. En effet, les mucines peuvent lier les sélectines à la surface des leukocytes et ainsi les inhiber (leur motilité, leur adhérence et l'extravasation). Les mucines peuvent également former une solide barrière protectrice autour des cellules cancéreuses. Les mucines ont également la capacité de séquestrer certaines cytokines, ceci ayant pour effet de supprimer la réponse immune (HOLLINGWORTH et SWANSON, 2004). Les cellules NK, cellules spécialisées dans la lyse des cellules transformées, dont les cellules cancéreuses, possèdent à leur surface différents récepteurs d'activation (KAR) ou d'inhibition (KIR) de la lyse cellulaire. La lyse de la cellule cible se fera en fonction de la balance des signaux d'activation et d'inhibition de la lyse. Une cellule normale ne sera pas lysée car elle lie autant de KIR que de KAR des cellules NK. La cellule cancéreuse, quant à elle, possède plusieurs modifications dans l'expression de ses molécules de surface; un moyen de défense qu'elle peut acquérir contre cette cytotoxicité est de former des interactions avec plus de récepteurs KIR et l'expression de mucines pourrait coïncider avec l'évasion du système immunitaire (ZAMAI et al., 2007).

4. CA125

4.1 Historique

L'utilisation d'un anticorps (OC125) dirigé contre la lignée cellulaire OVCA433 (obtenue d'une patiente atteinte d'un cystadenocarcinome papillaire ovarien) a permis la découverte de la protéine qui a été identifiée sous le nom de CA125 (cancer antigen 125) par l'équipe du Dr Robert C. Bast Jr en 1981 (BAST et al., 1981). Cet anticorps réagissait avec un antigène de surface des cellules cancéreuses de l'ovaire (BAST et al., 1981), plus particulièrement les tumeurs ovariennes de type séreux (KABAWAT et al., 1983). CA125 a ensuite été détecté dans plusieurs autres tissus sécrétoires normaux et d'autres carcinomes mais a aussi été établi comme marqueur du cancer de l'ovaire. Il est couramment utilisé comme outil de détection et de suivi des patientes (HARDARDOTTIR et al., 1990; ZURAWSKI et al., 1988; O'BRIEN et al., 1986; BAST et al., 1983). Depuis sa découverte, plusieurs recherches sont faites sur sa structure, ses fonctions physiologiques et son potentiel clinique.

4.2 Importance clinique

Depuis sa découverte, CA125 a été le sujet de plusieurs avancées concernant son utilisation clinique. Il est détecté à la face apicale des cellules normales de la plèvre, du péricarde, du péritonéum, des trompes de Fallope, de l'endomètre et de l'endocol mais pas de l'épithélium normal de l'ovaire (BAST et al., 1983; BERCHUCK et al., 1989). Il est détecté aussi dans les liquides biologiques normaux comme le lait, le mucus cervical, le plasma séminal, le sérum des femmes enceintes durant le premier trimestre de la grossesse et le liquide amniotique

(BARBATI et al., 1990). Approximativement 80% des cancers de l'ovaire expriment CA125, les tumeurs séreuses étant plus souvent positives pour l'expression de CA125 que les tumeurs endométrioïdes et à cellules claires, tandis que les tumeurs mucineuses sont quasi négatives (BAST et al., 1998). On dit que CA125 sérique est un marqueur pour le suivi des patientes de cancer épithélial de l'ovaire (BAST et al., 1983; GUPPY et RUSTIN, 2002). En effet, une concentration sérique faible de CA125 (< 35 U/mL) corrèle avec un état normal chez la femme. Lorsque cette concentration augmente, on dénote une progression de la tumeur tandis que lorsqu'elle diminue, elle reflète une régression de la tumeur. Ce suivi est fait grâce à un test clinique encore utilisé de nos jours consistant en un ELISA de type sandwich utilisant deux anticorps dirigés contre deux épitopes différents dans la partie extracellulaire de la protéine (BAST et al., 1983; WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003). Initialement, on estimait que l'élévation de la concentration de CA125 sérique était spécifique aux cancers ovariens; cependant, plusieurs conditions bénignes telles la grossesse, les inflammations pelviennes, la tuberculose, la cirrhose du foie et des conditions gynécologiques comme des kystes bénins aux ovaires, l'endométriose, les fibromes et la grossesse ectopique démontrent une élévation de CA125 (MEDEN et FATTAHI-MEIBODI, 1998). Également, au début de l'année 2007, une étude chez des patientes danoises (étude MALOVA) a montré une corrélation entre l'expression de CA125 des tissus et les niveaux sériques de CA125. De façon intéressante, 50% des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire en stade précoce présentent une élévation de la concentration sérique de CA125 et dans 50% des tumeurs de stade I, CA125 est détectable à leur surface (HOGDALL et al., 2007). Chez les stades avancés, par contre, plus de 80-95 % des patientes montrent des concentrations sériques de CA125 élevées (> 35 U/mL) alors qu'on observe une perte de CA125 à la surface de la tumeur (HOGDALL et al., 2007; BERCHUCK et al., 1989) malgré le fait que des études de micropuces démontrent que

CA125 est surexprimé dans les tumeurs de stades avancés (SAWIRIS et al., 2002). Les patientes en stades III et IV qui montrent des tumeurs CA125-négatives ont une survie significativement plus courte que les patientes aux tumeurs CA125-positives (HOGDALL et al., 2007).

4.3 Le gène *MUC16*

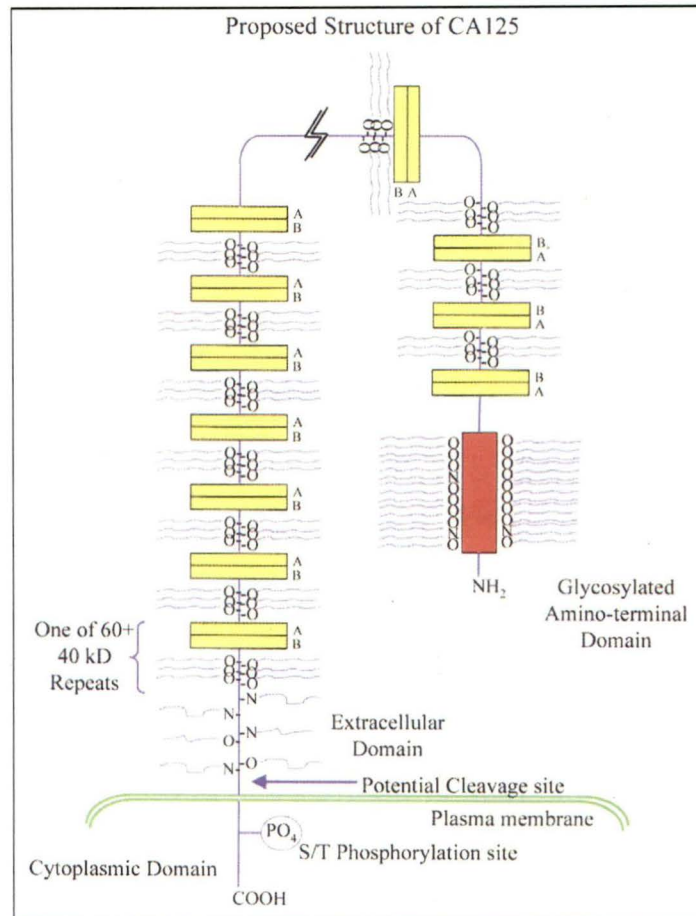
Le gène encodant la protéine CA125 est nommé *MUC16* et est situé aux loci p13.2-13.3 du chromosome 19 (KANEKO et al., 2003). Le gène *MUC16* comprend le plus long exon (21693 pb) de ce chromosome (GRIMWOOD et al., 2004).

L'ADNc partiel de CA125 a été isolé en 2001 par le groupe du Dr Lloyd (YIN et LLOYD, 2001). Cet ADNc possédait une séquence de 5797 pb comprenant un codon d'arrêt et une séquence poly(A) mais pas de séquence d'initiation, laissant croire que cette séquence demeurait partielle (Yin et Lloyd, 2001). La séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique trouvée possédait plusieurs caractéristiques des mucines. En effet, le groupe a déterminé que cette séquence était riche en sérine, thréonine et proline dans sa région N-terminale et qu'elle possédait neuf répétitions en tandem de 156 acides aminés partiellement conservées. La région C-terminale contenait un domaine transmembranaire probable (25 résidus hydrophobes) et un site potentiel de phosphorylation sur une tyrosine dans la courte queue cytoplasmique de 31 acides aminés (YIN et LLOYD, 2001).

Dans la même période, en 2001, un autre groupe, celui du Dr O'Brien, détermina une séquence de CA125 en clonant par une méthode de clivage contrôlé par le bromure de

cyanogène (CNBr) pour produire des fragments de 40 et 60 kDa (O'BRIEN et al., 2001). La structure générale de la séquence de CA125 déterminée par ce groupe est la même que celle du groupe du Dr Lloyd : une courte queue cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire dominé par un domaine de répétitions en tandem (O'BRIEN et al., 2001; voir figure 4). La différence entre les séquences des deux groupes consiste en un nombre différent de répétitions et la longueur du domaine N-terminal. O'Brien a évalué le nombre de répétitions à plus de 45 et pouvant même dépasser 60. La longueur totale de la protéine selon O'Brien serait évaluée à 22 152 acides aminés (O'BRIEN et al., 2001; O'BRIEN et al., 2002). La séquence déterminée par Lloyd est presque entièrement homologue à la portion 3' de l'ADNc déterminée par O'Brien. Des sites potentiels d'épissage d'alternatif et la possibilité de polymorphisme donnant lieu à différents variants peuvent être responsables de l'incertitude face à la longueur de la protéine (O'BRIEN et al., 2001). Encore à ce jour, la séquence exacte et complète de CA125 n'est pas confirmée. Une partie de CA125 a été clonée et est nommée FLJ14303 (AK024365). Elle contient les domaines cytoplasmique, transmembranaire, unique et 3 répétitions en tandem (HOVIG et al., 2001).

Figure 5 : Structure de CA125 proposée par le groupe de O'Brien (Tiré de O'BRIEN et al., 2001).



4.4 Structure protéique de CA125

CA125 est composé de 3 domaines et chacun de ces domaines de la protéine montre des caractéristiques particulières.

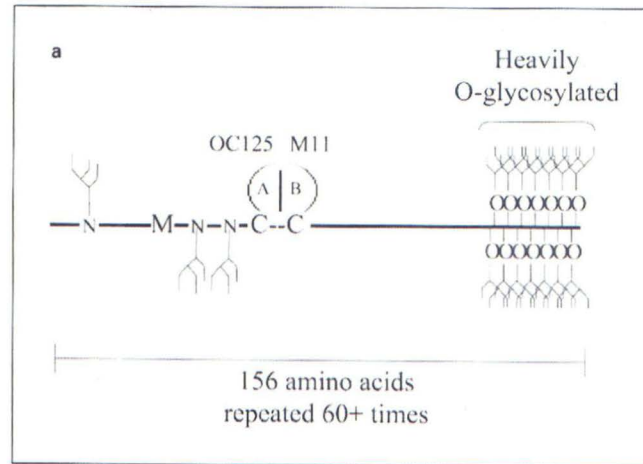
On connaît à ce jour certaines caractéristiques du domaine N-terminal de CA125 malgré sa séquence et sa longueur encore controversées. On sait par exemple qu'il possède un très grand potentiel pour des O-glycosylations dû à sa richesse en résidus sérine et thréonine. Ces

glycosylations pourraient être responsables des interactions avec la matrice extracellulaire. Une autre partie moins glycosylée de ce domaine pourrait être responsable des interactions protéine-protéine avec la matrice extracellulaire (O'BRIEN et al., 2001).

Le domaine des répétitions est un domaine très important de la protéine puisqu'il représente une portion majeure de la protéine, il porte les épitopes et donne à CA125 certaines des caractéristiques typiques des mucines. Les répétitions de 156 acides aminés chacune ont une séquence en acides aminés très semblable les unes aux autres sans être parfaitement identiques. Chaque unité répétitive possède une méthionine complètement conservée à la position 24, par exemple. Également, chaque répétition porte deux résidus cystéines aux positions 59 et 79 qui seraient potentiellement reliées par un pont disulfure et formeraient ainsi une boucle. Cette boucle étant conservée dans chacune des unités répétitives laisse croire à un rôle biologique important. Les épitopes OC125 (groupe A) et M11 (groupe B) (NUSTAD et al., 1996) sont situées dans cette boucle, structure leur permettant une bonne reconnaissance immune et un déficit en glycosylation dans l'environnement immédiat de la boucle. La partie N-terminale d'une répétition porterait quelques N-glycosylations tandis que la partie C-terminale étant très riche en résidus sérine, thréonine et proline, serait très fortement O-glycosylée (O'BRIEN et al., 2001).

Figure 6 : Représentation schématique d'une unité répétitive typique de CA125.

Une répétition de CA125 de 156 acides aminés contient quelques sites de N-glycosylation dans sa partie N-terminale et est très fortement O-glycosylée dans sa partie C-terminale. Une méthionine et deux cystéines sont très conservées parmi les répétitions de CA125. Les deux cystéines formeraient une boucle par un pont disulfure et cette boucle serait le site des épitopes OC125 (groupe A) et M11 (groupe B). (Tiré de O'BRIEN et al., 2001)



Le domaine C-terminal, quant à lui, est composé d'une partie extracellulaire n'ayant aucune homologie avec d'autres domaines de la protéine (appelé domaine unique). Ce domaine comporte également un domaine transmembranaire typique d'acides aminés hydrophobes puis une courte queue cytoplasmique. Le domaine unique comporterait un site potentiel de clivage protéolytique juxtamembranaire d'environ 50 acides aminés et permettrait possiblement le clivage et la relâche de CA125 (O'BRIEN et al., 2001). Il a été montré que la relâche de CA125 est précédée d'une phosphorylation maintenue par des inhibiteurs de phosphatases (FENDRICK et al., 1997). La queue cytoplasmique contient des sites potentiels de phosphorylation sérine/thréonine et tyrosine près du domaine transmembranaire dont la phosphorylation coïnciderait avec le clivage de CA125 (O'BRIEN et al., 2001; KONISHI et

al., 1994). De plus, le domaine cytoplasmique de CA125 contient un signal de localisation nucléaire potentiel (RRRKK).

Le cœur protéique de CA125 en fait une protéine évaluée à 2500 kDa (O'BRIEN et al., 2002). Le contenu en glycosylations est quant à lui évalué à 24-28 % de sa masse contrairement aux autres mucines chez lesquelles ce pourcentage s'élève à plus de 50% (DAVIS et al., 1986; LLOYD et al., 1997). La masse totale moyenne de CA125 pourrait donc s'élever jusqu'à environ 3500 kDa (O'BRIEN et al., 2002). Non seulement les O-glycosylations ont été montrées comme très présentes chez la molécule de CA125 mais une robuste composition en N-glycosylations a aussi été démontrée (WONG et al., 2003; DAVIS et al., 1986; NAGATA et al., 1991). L'analyse des glycosylations a d'ailleurs indiqué la présence de galactose, N-acétyl glucosamine, N-acétyl galactosamine, mannose, acide sialique et fucose (DAVIS et al., 1986; WONG et al., 2003).

La recherche de domaines conservés a révélé la présence de six domaines SEA dans la séquence en acides aminés connue de CA125 (YIN et LLOYD, 2001). Les domaines SEA ont été identifiés pour la première fois comme souvent retrouvés chez les protéines *sea urchin sperm protein*, *entorokine* et *agrin*, d'où il tire son nom. Cinq de ces domaines se trouveraient dans la région des répétitions et le dernier se retrouve dans le domaine unique. Les domaines SEA existent toujours dans la partie extracellulaire des protéines et sont souvent accompagnés de O-glycosylations vers la portion N-terminale, comme les répétitions de CA125 (MAEDA et al., 2004). Le domaine SEA servirait pour l'autoprotéolyse de la protéine et possiblement à l'association non-covalente des fragments générés par la

protéolyse, comme démontré dans le cas de la mucine MUC1 et Muc3 (PALMAI-PALLAG et al., 2005; LEVITIN et al., 2005; KHATRI et al., 2003)

4.5 Expression et propriétés de la protéine CA125

L'expression et la relâche de CA125 peuvent être influencées par divers facteurs. Elles sont d'abord régulées par la division et le cycle cellulaire (MARTH et al., 1998; BECK et al., 1998). Les cellules cancéreuses de l'ovaire qui croissent de façon exponentielle (donc un grande proportion de cellules en phases S et G2/M) montrent une expression et une relâche de CA125 diminuée. Sa relâche est dépendante de la densité cellulaire, c'est-à-dire qu'à une densité de cellules moyenne, les cellules ont suffisamment de facteurs de croissance disponibles et assez d'espace pour se diviser et on retrouve une diminution de la présence de CA125 autant dans le cytosol que dans le milieu conditionné (MARTH et al., 1998). Les cytokines et facteurs de croissance ont également le pouvoir de stimuler l'expression et la relâche de CA125. Par exemple, l'interféron- γ et le TGF- α stimulent l'expression de CA125 (KURACHI et al., 1996; MARTH et al., 1989; MARTH et al., 1998). Il a aussi été suggéré que IL-1 et TNF menaient à une déplétion précoce de CA125 cellulaire suivi de l'inhibition de sa synthèse (Marth et al., 1998). TGF- β a été montré comme réduisant l'expression de CA125 (MARTH et al., 1990).

Une colocalisation de EGF-R et CA125 a été démontrée par immunohistochimie à la surface cellulaire. On pourrait supposer que le complexe EGF/EGFR servirait probablement à activer la sécrétion de CA125 et que cette sécrétion requiert une phosphorylation d'une tyrosine (FENDRICK et al., 1997; KONISHI et al., 1994).

4.6 Rôles connus de CA125

En plus de 25 ans de recherche sur CA125, les fonctions de cette mucine demeurent encore très peu connues. Certains rôles de CA125 ont été proposés : adhésion cellulaire, invasion et métastases intrapéritonéales. On peut attribuer cette fonction grâce à l'observation montrant une interaction entre CA125 et la mésothéline, protéine hautement exprimée à la surface péritonéale (GUBBELS et al., 2006). Aussi, CA125 serait une protéase pouvant cliver d'autres protéines, ce qui favoriserait également l'invasion des cellules cancéreuses de l'ovaire. CA125 aurait aussi un rôle de lubrifiant, fonction caractéristique des mucines et protéines fortement glycosylées. On a aussi démontré un rôle de CA125 dans la suppression de la réponse immunitaire, par exemple en inhibant la réponse des cellules NK in vitro (PATANKAR et al., 2005). CA125 a aussi été montrée comme liant la galectine-1, faisant partie de la famille de protéines de type lectine liant les sucres β -galactoside des glycosylations. (HUGUES, 1997) Elles sont entre autres impliquées dans la modulation de l'adhésion, la prolifération et la mort cellulaires et dans le processus métastatique. (DANGUY et al, 2002; PERILLO et al, 1998) L'interaction CA125-galectine-1 suggère donc une implication de la galectine-1 dans la liaison des cellules CA125-positives à la matrice extracellulaire.

4.7 Modèles d'études de CA125 établis antérieurement dans le laboratoire

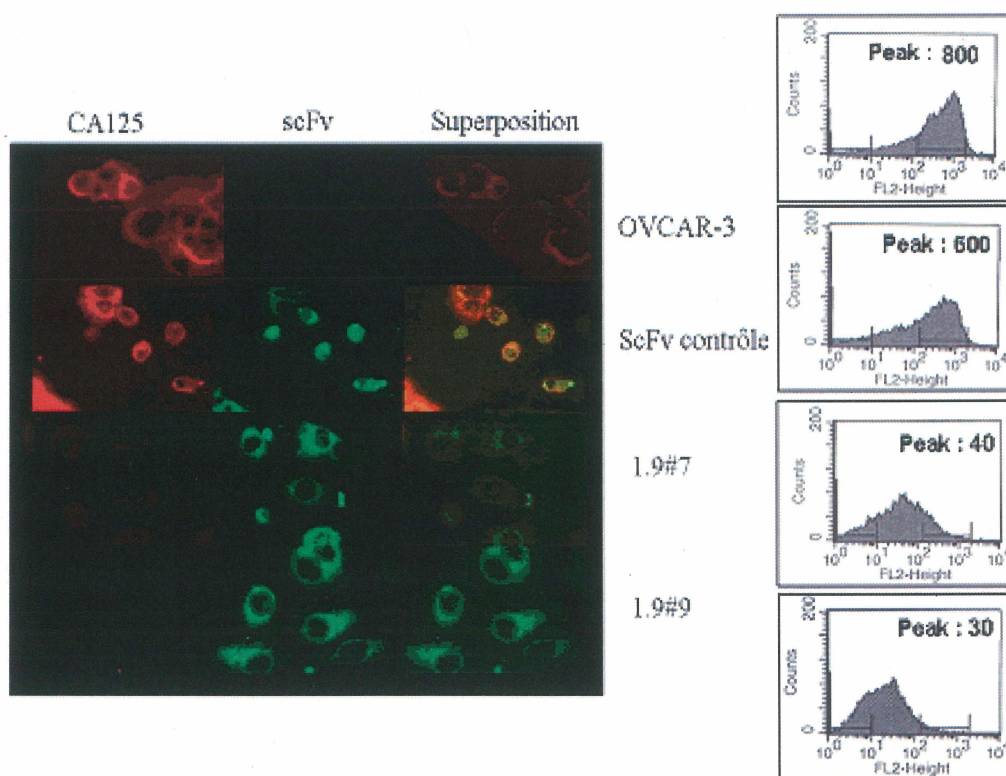
Deux modèles d'étude de la mucine CA125 dans le cancer de l'ovaire ont été mis au point dans le laboratoire : un modèle de perte de fonction, c'est-à-dire qu'on a bloqué l'expression de surface de CA125 chez des cellules l'exprimant fortement en temps normal et un modèle gain de fonction, c'est-à-dire qu'on a forcé l'expression de certains domaines de la protéine CA125 par des cellules CA125-négatives.

4.7.1 Modèle de perte de fonction (knockdown)

Des clones stables knockdown pour CA125 ont été établis à partir de la lignée cellulaire de cancer de l'ovaire NIH :OVCAR-3, cellules CA125-positives. Un scFv (single-chain fragment variable ou mini-anticorps) a été construit. Ce scFv est spécifique à la portion extracellulaire de CA125 (domaine des répétitions) et contient un signal de sécrétion et une séquence de localisation au réticulum endoplasmique KDEL. De cette façon, le scFv sera une protéine résidente du réticulum endoplasmique. Lorsque CA125, reconnu pour emprunter la voie de sécrétion pour être exprimé à la surface cellulaire, passera par le RE, il sera séquestré à ce compartiment cellulaire. On dira donc que les clones stables générés imitent un knockdown de CA125. Ces clones ont été validés pour la diminution d'expression de CA125 (Figure 5) et la construction et l'étude de ces clones ont constitué le thème du mémoire de maîtrise de Julie Beaudin (BEAUDIN, 2003).

Figure 7 : Validation des clones knockdown de CA125

Les clones stables sont dérivés de la lignée cellulaire NIH :OVCAR-3. Les clones nommés 1:9#9 et 1:9#7 expriment un scFv situé au RE qui permet de séquestrer CA125 dans ce compartiment de la cellule et constituent les cellules CA125-knockdown. Le clone ScFv contrôle est une lignée cellulaire qui exprime un scFv ne liant pas CA125. Les quatre lignées cellulaires (la lignée parentale et les 3 clones stables) ont été validés pour leur expression de CA125 (en rouge) et du scFv (en vert) par immunofluorescence indirecte sur lame avec des cellules perméabilisées. La diminution d'expression de surface de CA125 chez les clones knockdown a également été prouvée par cytométrie de flux avec des cellules non-perméabilisées.



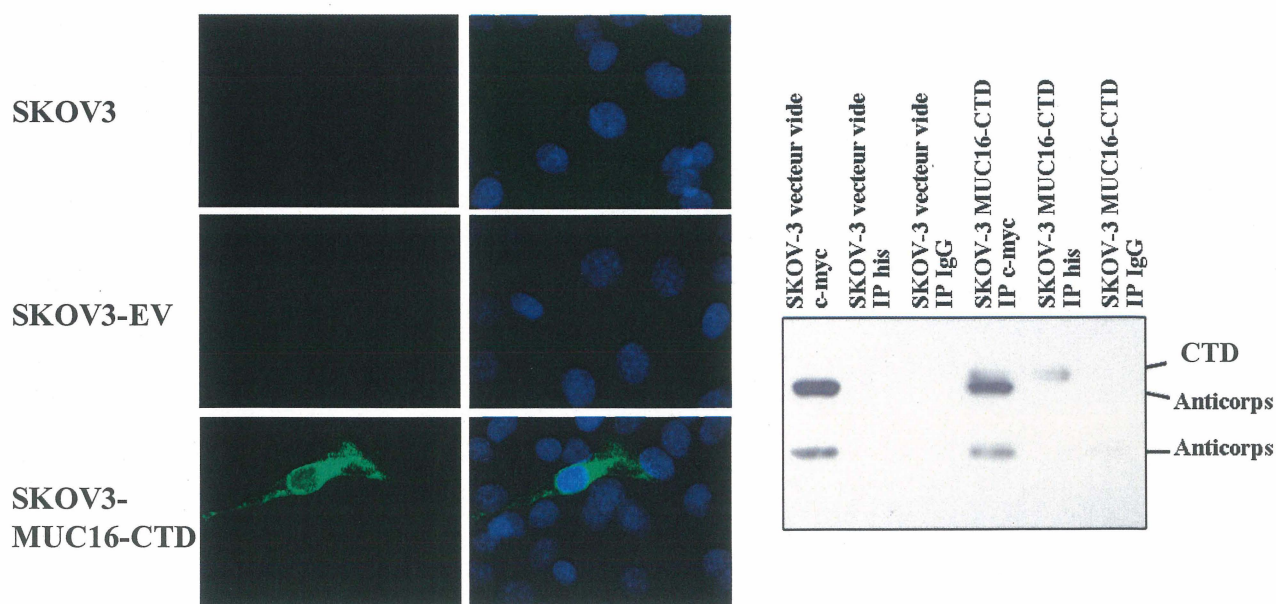
4.7.2 Modèle de gain de fonction

Une population stable exprimant le domaine C-terminal (CTD) de CA125 a été générée à l'aide d'une lignée cellulaire de cancer ovarien SKOV3, des cellules CA125-négatives. La

séquence des domaines cytoplasmique, transmembranaire et unique a été clonée dans un plasmide permettant de former une protéine de fusion avec deux étiquettes, polyhistidine et c-myc, toutes deux situées en C-terminal de la protéine. Cette population stable, la population stable contrôle (exprimant le plasmide seul, EV) et la lignée parentale ont été validées pour leur expression de la protéine CTD à la bonne localisation cellulaire, c'est-à-dire membranaire. Ces constructions ont été fabriquées et validées en partie par Marianne Boivin (BOIVIN, 2005). Les validations ont été faites par immunofluorescence indirecte sur lame et par immunoprécipitation suivie d'un gel SDS-PAGE.

Figure 8 : Validation de la population SKOV3-MUC16-CTD.

Les populations stables sont dérivées de la lignée cellulaire SKOV3. La population stable nommée SKOV3-MUC16-CTD exprime le domaine C-terminal de CA125 tandis que la population SKOV3-EV contient seulement le vecteur vide. Les trois lignées cellulaires (la lignée parentale et les 2 populations stables) ont été validées pour leur expression de la construction MUC16-CTD (en vert) par immunofluorescence indirecte sur lame avec des cellules perméabilisées (en bleu, l'ADN des noyaux des cellules coloré au DAPI). L'expression de la protéine MUC16-CTD a également été prouvée par immunoprécipitation avec les étiquettes polyhistidine et c-myc de la protéine de fusion suivie d'un gel SDS-PAGE.



4.7.3 Phénotypes observés et rôles attribués à CA125 déterminés à l'aide des modèles d'étude

Ces modèles d'études ont permis d'attribuer des rôles au marqueur de cancer de l'ovaire CA125 dans ces contextes cellulaires particuliers à partir de différents essais phénotypiques expérimentés (tableau 3). La perte de CA125 à la membrane cellulaire augmente la sensibilité à l'inhibition de contact, diminue l'adhésion cellule-cellule (peu de croissance en absence d'ancrage et de formation de sphéroïdes), diminue la tumorigénicité chez les souris, favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et augmente la migration cellulaire. Dans le cas du modèle de gain de fonction par le domaine C-terminal de CA125, on a observé une diminution de l'inhibition de contact, une augmentation de l'adhésion cellule-cellule, une augmentation de la tumorigénicité chez les souris. La morphologie de la lignée cellulaire utilisée était au départ mésenchymateuse et n'a pas été altérée avec le gain de fonction. Finalement, la migration cellulaire est aussi augmentée avec le gain de fonction (BEAUDIN, 2003, PINARD, 2005). Toutes ces données mises ensemble suggèrent que CA125 pourrait être considéré comme un oncogène puisqu'il contribue à augmenter la tumorigénicité des cellules qui l'expriment. De plus, on peut également suggérer de ces observations que le domaine C-terminal de CA125 est suffisant pour conférer ces rôles à CA125.

Tableau 3 : Phénotypes observés chez les modèles d'études de CA125 antérieurement dans le laboratoire. (Données non-publiées)

Phénotype observé	Modèle perte de fonction (knockdown)	Modèle gain de fonction (MUC16-CTD)
Temps de doublement	Aucun effet	Aucun effet
Sensibilité à l'inhibition de contact	↑	↓
Croissance en absence d'ancrage (milieu semi-solide)	↓	↑
Formation de foyers post-confluence	↓	↑
Formation de sphéroïdes	↓↓	↑↑
Formation de tumeurs chez souris NUDE et SCID	Non	Oui
Morphologie cellulaire	Épithéliale ↓ Mésenchymateuse	Mésenchymateuse ↓ Mésenchymateuse
Migration	↑	↑

D'autres part, les clones CA125-knockdown ont été montrés comme étant plus sensibles aux agents chimiothérapeutiques génotoxiques (BOIVIN, 2005) et aux cytokines cytotoxiques TRAIL et FasL (données non-publiées) que les cellules exprimant CA125.

Des interactions suggérant certaines fonctions de CA125 ont également été observées dans le laboratoire. Des co-immunoprécipitations entre CA125, la β -caténine et E-cadhérine ont été montrées (données non-publiées). Ces interactions suggèrent un rôle de CA125 dans la progression du cancer de l'ovaire puisque ces protéines sont impliquées entre autres dans la

progression du cancer du sein (SCHROEDER et al., 2003). De plus, un criblage par double-hybride chez la levure a montré des interactions de la queue cytoplasmique de CA125 avec les sous-unités F0/F1 de l'ATP-synthase et avec RNF5 (données non-publiées). L'ATP-synthase est une protéine mitochondriale, ce qui suggérerait que la queue cytoplasmique de CA125 serait transloquée vers cet organelle. RNF5 est une protéine à motif "ring finger" et est un modulateur de la motilité cellulaire par son action sur la paxilline. (DIDIER et al, 2003).

5. Hypothèse et objectif

CA125 est une immense protéine comportant plusieurs domaines. Chacun de ces domaines possède des caractéristiques structurales particulières pouvant lui conférer des fonctions précises dans divers processus cellulaires impliqués dans le développement et la progression métastatique du cancer épithélial de l'ovaire. Connaissant les phénotypes associés à une perte de fonction et ceux associés au gain de fonction (du domaine C-terminal de CA125), il est possible de suggérer certains rôles de la protéine et du domaine C-terminal. De façon générale, notre laboratoire suggère par les observations faites jusqu'à maintenant que la présence de CA125 à la surface des cellules tumorales augmente leur potentiel tumorigénique. On connaît également des interactions du domaine des répétitions de CA125 avec différentes protéines telles que la mésothéline et la galectine-1.

Notre hypothèse est que le domaine extracellulaire de CA125 (domaine unique et domaine des répétitions) est important dans le développement, la tumorigénicité et la progression métastatique des cellules tumorales de l'ovaire. Notre objectif principal est donc de

déterminer l'influence du domaine extracellulaire de CA125 dans son microenvironnement (cellules mésothéliales et lymphocytes) et sur les phénotypes observés chez les modèles de perte et de gain de fonction. Pour ce faire, des essais avec les clones stables CA125-knockdown seront effectués et des populations stables exprimant les différentes parties du domaine extracellulaire de CA125 seront produites, validées et testées pour vérifier leur tumorigénicité et potentiel métastatique (comparé à leurs contrôles).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

6. Culture cellulaire

Toutes les lignées cellulaires utilisées sont cultivées à 37°C en présence de 5% CO₂. La lignée cellulaire NIH :OVCAR-3 (ATCC, Manassas, VA) est une lignée cellulaire provenant de l'ascite d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome séreux de l'ovaire. Cette lignée est cultivée dans du milieu RPMI 1640 (Wisent Inc, St-Bruno, Québec) supplémenté de 20% FBS (Wisent Inc, St-Bruno, Québec), 10 µg/mL insuline (Sigma, St-Louis, Missouri) , 2,5 µg/mL amphotéricine B (Wisent Inc, St-Bruno, Québec), 2 mM L-glutamine (Wisent Inc, St-Bruno, Québec), 100 µg/mL streptomycine (Wisent Inc, St-Bruno, Québec) et 1 U/mL pénicilline (Wisent Inc, St-Bruno, Québec). Les populations stables dérivant de cette lignée cellulaire sont cultivées dans le même milieu de culture contenant un agent de sélection, c'est-à-dire 1 µg/ml blasticidine (CN Biosciences, San Diego, CA). Le passage cellulaire de cette lignée s'effectue dans un ratio de 1 :3 à tous les 3-4 jours, c'est-à-dire lorsque la confluence des cellules atteint 90-100 %.

La lignée cellulaire SKOV3 (ATCC, Manassas, VA) est également une lignée cellulaire provenant de l'ascite d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome séreux de l'ovaire. Cette lignée est cultivée dans du milieu DMEM/F12 50/50 mix (Wisent Inc, St-Bruno, Québec) supplémenté de 10% FBS, 2,5 µg/mL amphotéricine B, 4 mM L-glutamine, 100 µg/mL streptomycine et 1 U/mL pénicilline. Pour la culture des populations stables dérivant de cette lignée cellulaire, on ajoute à ce milieu de culture 2 µg/ml blasticidine. Le passage cellulaire

de cette lignée s'effectue dans un ratio de 1 :3 à tous les 3-4 jours lorsque la confluence est de 80-90 %.

La lignée cellulaire 293T provient de la lignée parentale 293 établie de cellules primaires humaines embryonnaires de rein transformées avec l'ADN de l'adénovirus humain type 5. Cette lignée est cultivée dans du milieu DMEM (Wisent Inc, St-Bruno, Québec) supplémenté de 10% FBS, 2,5 µg/mL amphotéricine B, 2 mM L-glutamine, 100 µg/mL streptomycine et 1 U/mL pénicilline, 0,1 µM mélange d'acides aminés non-essentiels (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario). Le passage cellulaire de cette lignée s'effectue dans un ratio de 1 :7 ou 1 :8 à tous les 3 jours.

La lignée cellulaire HTB-30 est une lignée provenant de l'effusion pleurale d'un adénocarcinome du sein. Elle est cultivée dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% FBS, 2,5 µg/mL amphotéricine B, 2 mM L-glutamine, 100 µg/mL streptomycine et 1 U/mL pénicilline. Ces cellules sont passées 1 :3 une fois par semaine.

La lignée cellulaire NKL est dérivée de cellules NK de patient de leucémie/lymphome. Cette lignée est cultivée dans le milieu DMEM supplémenté de 10% FBS, 2,5 µg/mL amphotéricine B, 2 mM L-glutamine, 100 µg/mL streptomycine et 1 U/mL pénicilline, 1000 U/mL interleukine-2. Le passage cellulaire de cette lignée s'effectue dans un ratio de 1 :10 ou à tous les 3 jours.

Lors d'un passage cellulaire, le milieu de culture des cellules a été retiré et les cellules ont été lavées avec 5 mL de PBS (Wisent Inc, St-Bruno, Québec) afin de neutraliser les inhibiteurs

de trypsine se trouvant dans le sérum du milieu de culture (cette étape est évitée pour les cellules 293T car le PBS les fait décoller). Un mélange de 0,05% trypsine / 0,53 mM EDTA (Wisent Inc, St-Bruno, Québec) ou 0,53 mM EDTA (Wisent Inc, St-Bruno, Québec) (2 mL) ont été ajoutés au contenant de cellules ensuite placé à 37°C pour une durée de 2 à 10 minutes dépendant de la lignée cellulaire et de la solution utilisée pour décoller les cellules. Les cellules ont ensuite été récoltées en rinçant les flacons avec 5 mL de milieu de culture et placées dans un tube conique de 15 mL pour être centrifugées à 1000 RPM durant 5 minutes dans une centrifugeuse Labofuge 400R (VWR, Montréal, Québec). Le surnageant a été aspiré et le culot resuspendu dans du milieu de culture pour être divisé entre les flacons de culture cellulaire T-75 (BD Falcon, Bedford, MA), le volume total de culture étant de 10 mL.

7. « Western blot overlay »

L'essai de liaison CA125 soluble / mésothéline recombinante a été réalisé comme décrit dans l'article de GUBBELS et al., 2006 (voir annexe 1). Brièvement, le CA125 soluble isolé d'ascites de patientes et des cellules OVCAR-3 (description de l'isolation dans WONG et al., 2003) a été séparé sur gel SDS-PAGE. La membrane de PVDF sur laquelle a été transférée la protéine a été incubée avec la mésothéline recombinante (meso-Fc, partie Fc d'un anticorps de lapin) toute la nuit. Le lendemain, la membrane a été lavée puis incubée avec un anticorps anti-mésothéline et l'anticorps secondaire anti-souris couplé à une peroxidase (tableau 3).

8. Cytométrie de flux – liaison mésothéline/CA125

L'essai de liaison de la mésothéline recombinante aux cellules CA125-positives et –négatives a été réalisé comme décrit dans l'article de GUBBELS et al., 2006 (voir annexe 1).

L'essai de formation de doublets homo- et hétérotypiques entre les cellules CA125-positives et les cellules exprimant la mésothéline est également décrit dans le même article.

9. Isolation de cellules NK à partir de sang frais

L'isolation de cellules NK à partir de 40 mL de sang prélevé chez des donneurs a été réalisée à l'aide de Histopaque® (Sigma Aldrich, St-Louis, MO) et selon les instructions du fabricant.

10. Cytométrie de flux – détermination de la présence de CA125 à la surface des lymphocytes

La détermination de la présence de CA125 à la surface des lymphocytes de donneurs normaux lorsqu'incubé 72 heures dans l'ascites de patiente CA125-positif a été fait grâce à une cytométrie de flux décrite dans l'article de BELISLE et al., 2007 (annexe 2). Le même type d'expérience a été réalisé avec des lymphocytes du sang et de liquide péritonéal de patientes.

11. Essai de cytotoxicité

Les cellules OVCAR-3, scFv contrôle et les clones 1 :9#9 et 1 :9#7 ont été ensemencés en triplicatas dans des plaques 12-puits à raison de 250 000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules NKL ont été ajoutées aux plaques de cellules CA125-positives et –négatives dans un ratio cellules cibles : cellules effectrices de 1 :1. Les co-cultures de cellules ont été incubées à 37°C et 5% CO₂. Après 72 heures d'incubation, le nombre de colonies et de cellules vivantes dans 5 champs de microscope déterminés aléatoirement pour chacun des puits ont été dénombrées.

12. Description des plasmides

Les cartes des plasmides utilisés sont illustrées à la figure 9. Le plasmide pME18S-FL3 (Helix Research Institute, Japon) (Genbank #AB009864) est un vecteur d'expression eucaryote dans lequel différents ADNc d'une librairie ont été clonés. Parmi eux, se trouve l'ADNc de FLJ14303, gène incluant le domaine cytoplasmique, le domaine transmembranaire (TM) le domaine unique (U) et 3 répétitions de CA125 (R).

Le plasmide pShuttle-CMV est un vecteur de transfert adénoviral. Il contient un site de clonage multiple dans lequel a été cloné des gènes en aval du promoteur fort humain CMV permettant l'expression constitutive des gènes chez plusieurs lignées cellulaires. Le plasmide possède aussi un signal de polyadénylation, ce qui permet la protection de l'extrémité 3' de l'ARNm. La taille maximale d'ADN pouvant être cloné dans ce plasmide est de 6.6 kb.

PShuttle-CMV a été utilisé ici dans le but de construire une cassette d'expression de protéines recombinantes.

Le plasmide pLenti6/V5 (Invitrogen, Carlsbad, CA) contient, lui aussi le promoteur fort CMV. Il contient également le promoteur SV40 qui dirige l'expression de la blasticidine. Il y a présence des gènes de résistance à la blasticidine et à l'ampicilline pour la sélection des cellules transformées dans les cellules eucaryotes et procaryotes, respectivement. Les Long Terminal Repeats (LTR) 5' et 3' dérivés de HIV-1 permettent l'empaquetage du virus et la transcription inverse de l'ARNm. Le plasmide possède aussi la séquence d'empaquetage viral HIV-1 psi (Ψ). En C-terminal du gène cloné se trouve un épitope V5. L'origine de répllication pUC permet une répllication « high-copy » du plasmide chez la bactérie.

Les plasmides pLP1, pLP2, pLP/VSVG sont des plasmides apportant les fonctions virales en *trans*. Tous trois possèdent l'origine de répllication pUC qui leur permet une répllication « high-copy » et d'être maintenus dans la bactérie. Ils possèdent également le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection en bactérie. Les gènes exprimés par les vecteurs pLP1 et pLP/VSVG sont sous le contrôle du promoteur fort CMV. Ces deux mêmes plasmides contiennent l'intron de la β -globine servant à augmenter l'expression des gènes *gag* et *pol* dans le cas de pLP1 et de VSV-G pour pLP/VSVG. Les gènes *gag* et *pol* codent respectivement pour les protéines virales de structure et pour des enzymes de répllication virales et d'intégration du lentivirus. Dans le cas de pLP2, le promoteur RSV contrôle l'expression du gène *rev*. La protéine Rev interagit avec le « Rev responsive element » (RRE) du plasmide pLP1 pour induire l'expression de Gag et Pol et agit sur le plasmide pLenti6/V5 pour promouvoir l'export nucléaire de l'ARN viral non-épissé pour l'empaquetage des

13. Construction de la cassette d'expression

13.1 Production d'adaptateurs

La cassette d'expression a d'abord été construite en 3 parties dans le plasmide pShuttle-CMV. Chacune des parties constitue un adaptateur en soi. Les couples d'oligonucléotides #1, #2 et #3 (tableau 2) sont des amorces complémentaires. L'appariement des 2 oligonucléotides a été fait en mélangeant les 2 amorces à une concentration finale de 100 nmole/mL chacun dans un tampon d'appariement 1X (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 50 mM EDTA, dans l'eau DEPC) et en plaçant la solution à 65°C pour 10 minutes. La solution d'adaptateur a ensuite été retirée du bain et refroidie à la température ambiante durant 1-2 heures. Les adaptateurs ainsi produits possèdent des extrémités à bouts cohésifs et sont donc prêts à être assemblés au plasmide par ligation.

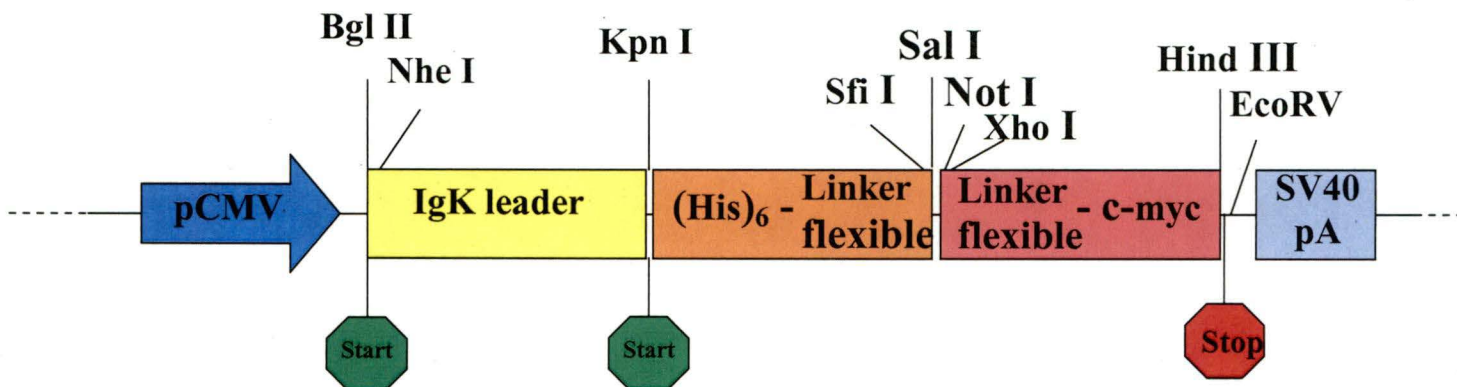
13.2 Clonage

1 µg de plasmide pShuttle-CMV a été digéré par 100 U de l'enzyme de restriction Bgl II (New England Biolabs, Pickering, Ontario) additionné de 2.5 µL de tampon 10X NEB 3 (New England Biolabs, Pickering, Ontario) et 100 µg/ml de BSA (New England Biolabs, Pickering, Ontario). Le volume a été ajusté à 25 µL avec de l'eau stérile et la réaction a été incubée à 37°C durant 2 heures. L'ADN a ainsi été linéarisé par digestion par Bgl II. Il a ensuite été précipité en ajoutant dans l'ordre 1 µL d'une solution 20 mg/mL de glycogène (Roche, Mississauga, Ontario), 2.5 µL d'une solution de NH₄OAc 7.5 M et 62.5 µL d'éthanol 95% froid. La précipitation de l'ADN s'est fait à -80°C durant 1 heure. La solution d'ADN a

été centrifugée à 13000 RPM durant 15 minutes à 4°C puis le culot d'ADN a été lavé avec de l'éthanol 70% froid et centrifugé à 13000 RPM durant 5 minutes. Le culot d'ADN a été séché et resuspendu dans 20 µL d'eau. Pour ajouter le premier adaptateur au plasmide, l'ADN plasmidique a ensuite été digéré par 100 U d'enzyme Kpn I (New England Biolabs, Pickering, Ontario), réaction incluant aussi 3 µL de tampon 10X NEB 3 (New England Biolabs, Pickering, Ontario), 100 µg/ml de BSA (New England Biolabs, Pickering, Ontario) et le volume complété à 30 µL avec de l'eau stérile. L'adaptateur codant pour le signal de sécrétion IgK leader et le plasmide digéré ont été ligués suivant ces proportions : 10 µL d'adaptateur (insert), 1 µL de plasmide digéré Bgl II/Kpn I, 1.5 µL de tampon de ligation 10X (New England Biolabs, Pickering, Ontario), 1 µL de T4 DNA ligase (New England Biolabs, Pickering, Ontario) et 1.5 µL d'eau stérile. Pour compléter la réaction à 15 µL. La réaction de ligation a été faite à 16°C toute la nuit. Les mêmes étapes ont été suivies pour ajouter, dans l'ordre, les adaptateurs codant pour l'étiquette (His)₆+linker flexible (enzymes de restriction utilisées : Kpn I et Sal I (New England Biolabs, Pickering, Ontario)) et pour le second linker flexible+l'étiquette c-myc (enzymes utilisées : Not I (New England Biolabs, Pickering, Ontario) et Hind III (New England Biolabs, Pickering, Ontario)) (voir figure 10).

Figure 10 : Schématisation de la cassette d'expression fabriquée.

Dans le site de clonage multiple de pShuttle-CMV, situé entre le promoteur CMV et le signal de polyadénylation de SV40, a été ajouté en trois parties (adaptateurs) le signal de sécrétion IgK leader, l'étiquette poly-His (His)₆ suivie d'un linker flexible (G₃S)₃, un second linker flexible (G₃S)₃ précédant l'étiquette c-myc. Tous les sites de restriction utilisés sont indiqués sur la figure. Les domaines de CA125 ont été clonés dans cette cassette à l'aide des sites de restriction Sfi I et Not I. Les octogones verts et rouge indiquent les codons start et stop, respectivement.



13.3 Transformation des bactéries XL1 par choc thermique

Après chacune des ligations, une transformation bactérienne par choc thermique était effectuée. Des bactéries XL1 Blue (Stratagen, Cedar Creek, TX) ont d'abord été rendues compétentes par la méthode du livre de référence Molecular cloning, A laboratory Manual. (SAMBROOK et RUSSELL, Vol.1 p1.116-1.118, Protocole 25) et congelées à -80°C en aliquots de 200 µL. Pour la transformation, les bactéries ont été dégelées sur glace. L'ADN plasmidique (volume total d'une réaction de ligation ou 50 ng d'ADN plasmidique contrôle) a été mélangé avec les bactéries et le tout incubé sur glace pour 10 minutes. Le mélange ADN/bactéries a subi le choc thermique lorsque les tubes ont été placés à 42°C durant 90 secondes puis remis sur glace pour 2 minutes. 800 µL de milieu LB (5 g/L Yeast extract

(EMD Chemicals, Darmstadt, Allemagne), 10 g/L NaCl, 10 g/L bactotryptone (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) chauffé à 37 °C aux bactéries. Les bactéries ont alors été incubées à 37°C sous agitation durant une heure. Les bactéries ont été par la suite étalées sur pétris 10 cm LB/agar sélectifs (kanamycine (Roche, Mississauga, Ontario) 100 µg/ml, le plasmide pShuttle-CMV possédant le gène de résistance à cet antibiotique). Les pétris ont été incubés à l'envers toute la nuit à 37 °C.

Plusieurs colonies ont été obtenues et les clones positifs ont été déterminés par analyse de l'ADN plasmidique. Pour ce faire, les clones ont été amplifiés dans 5 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL de kanamycine durant toute une nuit à 37 °C sous agitation. L'extraction de l'ADN plasmidique des clones a été réalisée selon le protocole du livre de référence Molecular cloning, A laboratory Manual. (SAMBROOK et RUSSELL, Vol.1 p.1.32-1.34, Protocole 1). L'ADN plasmidique alors obtenu a été mis sur gel d'agarose 0.8% et leur taille a été vérifiée. Les clones positifs ont été confirmés en effectuant une réaction de digestion avec une enzyme de restriction digérant une seule fois dans le plasmide, plus particulièrement dans l'insert pour vérifier sa présence. Un clone positif a été déterminé et une grande quantité de son ADN plasmidique a été purifié à l'aide du système MaxiPrep de Qiagen (Qiagen, Mississauga, Canada). Dans le nouveau plasmide ainsi construit (pShuttle-CMV-IgK-His-myc) ont pu être clonés les domaines de CA125 recherchés.

13.4 Réaction de PCR

Afin d'amplifier l'ADN recherché (domaines de CA125), la réaction suivante a été préparée :
20 ng d'ADN plasmidique pME18S-FL3-cDNA contenant FLJ14303, 5 µL de tampon Pfu

Ultra 10X (Stratagen, La Jolla, CA, États-Unis), 0,4 μ L de dNTP 25 mM (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada), 0,8 μ L de chacune des deux amorces spécifique à l'ADN à amplifier préalablement diluées à une concentration de 50 nmoles/mL (les amorces utilisées sont décrites au tableau 4) et de l'eau pour compléter le volume à 49 μ L. Les amorces utilisées ont un site de restriction Sfi I en 5' et un site Not I en 3', permettant ainsi aux inserts d'être clonés dans le plasmide pShuttle-CMV-IgK-His-myc construit à cette fin. Les réactions ont été placées dans l'appareil PCR (Eppendorf Mastercycler, Brinkmann, Mississauga, Canada) et la réaction de PCR a commencé par une étape de pré-chauffage des échantillons à 94°C pour 5 minutes. 2,5 U d'enzyme Pfu DNA polymerase (produite par Catherine Desrosiers, Départ. Microbiologie) ont été ajoutés aux échantillons. 30 cycles de réaction ont ensuite été faits de la façon suivante : 94°C pour 1 minute, température d'appariement (voir tableau 2) pour 2 minutes et 72°C pour 2 minutes. Les produits de PCR alors obtenus ont été mis sur gel d'agarose LE (Roche diagnostics, Indianapolis, IN) à une concentration de 0.8% et contenant 1 μ g/mL de bromure d'éthidium (Pharmacia, Biotech, Suède). L'ADN a migré 30 minutes à 120V. Les produits PCR ont pu ainsi être visualisés en plaçant le gel sous lumière ultraviolette et à l'aide d'un appareil Bio/Can True View 300.

Tableau 4 : Conditions de PCR.

Amorces, température d'appariement et taille des produits de PCR. L'amorce 5' est décrite la première. Les amorces ont été produites par IDT Inc (Coralville, IA).

	ADN amplifié	Séquence des amorces	Température d'appariement	Taille du produit de PCR
1	Igk leader	5'GATCTGTATGCTAGCCACCATGGAGACAGACACAC TCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTC CACTGGTGACGGTAC 3' 5'CGTCACCAGTGGAACCTGGAACCCAGAGCAGCAGT ACCCATAGCAGGAGTGTGTCTGTCTCCATGGTGGCT AGCATACA 3'	65°C	87 pb
2	(His) ₆	5'CATGCACCACCACCACCACCACGGCGGGCAGCG GCGGCGGCAGCGGCGGGCAGCGGCCATCTAGGCC AAAG 3' 5'TCGACTTTGGCCTAGATGGCCGCTGCCGCCGCCG TGCCGCCGCCGCTGCCGCCGCCGTGGTGGTGGTGGT GGTGCATGGTAC 3'	65°C	83 pb
3	c-myc	5'GCCCCGCTCGAGTCGCGAGGCGGGCAGCGGCG GCGGCAGCGGCGGGCAGCGAACAAAACTCATCT CAGAAGAGGATCTGAATTGATCA 3' 5'AGCTTGATCAATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTT TTTGTTGCTGCCGCCGCCGCTGCCGCCGCCGCTGCC GCCGCTCGCGACTCGAGGC 3'	65°C	93 pb
4	Unique	5'ATGCGGCCATCTAGGCCACATCACCTGCTGAGGG ACA 3' 5'TTTTCCTTTTGCGGCCGCTGAAGGGAAGGTCAGAA TTCC 3'	55°C	723 pb
5	2 Répétitions	5'ATGCGGCCATCTAGGCCACGTTTCTAAACCTGGTC CCTC 3' 5'ATAGTTTAGCGGCCGCAGAGATGGCTGGCAGCTGA A 3'	65°C → 1 min (-1°C)/cycle de 30 sec pour 9 cycles 55°C → 1 min Pour 20 cycles	1019 pb
6	UTM	5'ATGCGGCCATCTAGGCCACATCACCTGCTGAGGG ACA 3' 5'ATTATCTTAAGCGGCCGCAGCGGGTGGTCACCAGG AC3'	55°C	805 pb
7	1RUTM	5'ATGCGGCCATCTAGGCCACGTTTCTAAACCTGGTC CCTC 3' 5'ATTATCTTAAGCGGCCGCAGCGGGTGGTCACCAGG AC 3'	55°C	2611 pb
8	Igk leader / c-myc	5'CGCGAATCCATTATGGAGACAGACACACTCCTG 3' 5'TGATATCTCAATTCAGATCCTCTTCTGAGATGA 3'	59°C	Variable selon la construction

9	Répétitions CA125 pour détection chez lymphocytes	5'CGTTAAGGAAAAAAGCGGCCGCBTGTTCAGAAGAAC ACCAGTGT 3' 5'GCAACTAGATCTGTCCCTGAAGGACTCTCTC 3'	65°C → 1 min (-1°C)/cycle de 30 sec pour 9 cycles 55°C → 1 min Pour 20 cycles	468 pb
10	Actine	5'GGACTTCGAGCAAGAGATGG 3' 5'AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG 3'	51°C	144 pb

13.5 Ligation et transformation par choc thermique

Après amplification des inserts recherchés, les réactions de PCR ont été mis sur gel d'agarose 0.8%. Les bandes recherchées (bons poids moléculaires lorsque comparées au standard 1kb DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) ont été découpées du gel et extraites de celui-ci grâce au QIAquick Gel extraction Kit de Qiagen (Qiagen, Mississauga, Canada) selon le protocole fourni par la compagnie. La totalité de l'ADN obtenu a subi une digestion enzymatique toute la nuit à 50°C par 100 U de Sfi I dans 5 µL de tampon 10X NEB 2 (New England Biolabs, Pickering, Ontario), 100 µg/ml de BSA et en complétant le volume à 50 µ L. Le lendemain, l'ADN a été précipité selon la méthode de précipitation d'ADN expliquée précédemment et digéré par l'enzyme Not.I avec les mêmes composantes et conditions de digestion que celle avec Kpn I expliquée à la section 13.2. Parallèlement aux digestions des inserts, le plasmide a été digéré par Sfi I, précipité puis digéré par Not I de la même manière. Les produits de PCR digérés ont été purifiés (enlever les protéines et oligonucléotides résultant de la digestion) par un QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen (Qiagen, Mississauga, Canada) selon les directives fournies. Les plasmides digérés ont aussi été purifiés (enlever les nucléotides

résultant de la digestion par Not I) grâce au QIAquick Gel extraction Kit de Qiagen (Qiagen, Mississauga, Canada) selon les directives expérimentales du fabricant. La concentration du plasmide et des insert a été évaluée à l'œil en faisant migrer les ADN sur gel d'agarose. La ligation plasmide / insert a été faite de la même manière que les ligations des adaptateurs avec pShuttle-CMV (voir section 13.1) et dans les mêmes proportions plasmide :insert (1 :10). Les réactions de ligations ont aussi été transformées par choc thermique dans les bactéries XL1 de la même manière qu'expliqué précédemment (voir section 13.3) de même que la détermination de clones positifs par extraction de leur ADN plasmidique.

14. Transfert des cassettes d'expression dans pLenti6/V5

Afin de pouvoir produire des lentivirus codant pour les domaines de CA125, les cassettes d'expression contenant les domaines de CA125 ont été transférées dans le plasmide pLenti6/V5. Pour ce faire, une digestion double par Bgl II et EcoRV (formant un bout franc) des plasmides pShuttle-CMV-Igk-His-myc + partie de CA125 a été faite pour sortir la cassette d'expression suivi d'une extraction sur gel pour obtenir l'insert seul. Le plasmide pLenti6/V5 a également été double digéré par BamHI (compatible avec Bgl II) et EcoRV. Le plasmide et les inserts ont été extraits sur gel de la même façon qu'expliqué précédemment. Les concentrations de plasmide et d'inserts ont été déterminées à l'œil par gel d'agarose et les réactions de ligation ont été préparées dans des ratios de 1 :10 (plasmide :insert).

14.1 Transformation des bactéries STBL3 par électroporation

Le plasmide pLenti6/V5 subi moins de recombinaison dans les bactéries STBL3 que dans les XL1. Des bactéries STBL3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) ont d'abord été rendues électrocompétentes par plusieurs étapes de lavages avec des solutions de faible force ionique et congelées à -80°C en aliquots de 40 µL. Pour la transformation, les bactéries ont été dégelées sur glace. L'ADN plasmidique (1 µL provenant d'une réaction de ligation ou 50 ng d'ADN plasmidique contrôle) a été mélangé avec les bactéries et le tout incubé sur glace pour une minute. Le mélange ADN/bactéries a été transféré dans une cuvette stérile (BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA) préalablement refroidie. La cuvette a été placée entre les bornes de l'électroporateur (Bio-Rad Gene pulser II) et le choc électrique (25 µF, 200 Pulses, 1.8 kV) a été produit durant 3-5 secondes. 1 mL de milieu LB chauffé à 37 °C a été ajouté dans la cuvette et le mélange a été recueilli dans un tube de 1.5 mL stérile. Les bactéries ont alors été incubées à 37 °C sous agitation durant une heure. Les bactéries ont été par la suite étalées sur pétris 10 cm LB/agar sélectifs (ampicilline (USB Corporation, Cleveland, OH) 100 µg/ml), le plasmide pLenti6/V5 possédant le gène de résistance à cet antibiotique. Les pétris ont été incubés à l'envers toute la nuit à 37 °C.

La vérification des clones obtenus s'est faite de la même manière que dans le cas de la transformation des bactéries XL1 par choc thermique excepté que l'ADN plasmidique a été extrait des bactéries STBL3 par le système QIAprep Spin Miniprep de Qiagen. Aussi, le système HiSpeed Plasmid Midi de Qiagen a été utilisé pour obtenir une plus grande quantité d'ADN plutôt que le système MaxiPrep de Qiagen.

15. Production des lentivirus

Au jour 1, les cellules 293T ont été ensemencées dans du milieu complet à raison de 5 000 000 cellules par flacon T-75 (BD Falcon, Bedford, MA) et incubés à 37°C et 5% CO₂. Le lendemain, les mélanges d'ADN à transfecter ont été préparés : 6 µg de chaque vecteur lentiviral (pLp1, pLp2, pLpVSVG) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 6 µg de du vecteur d'expression construit (pLenti6/V5 contenant le gène d'intérêt, pLenti6/V5 vide ou pLenti-GFP). Du milieu OptiMEM (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) a été ajouté à ce mélange (1.5 mL). Dans un autre tube a été préparé l'agent de transfection : 48 µL de lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) a été ajouté à 1.5 mL de OptiMEM et le mélange a été incubé 5 minutes à température ambiante. La solution d'agent de transfection et la préparation d'ADN ont été mélangés et le tout a été incubé durant 20 minutes à température ambiante. Pendant cette incubation, le milieu de culture des cellules 293T a été remplacé par le milieu OptiMEM. À la fin de l'incubation de 20 minutes, le mélange des 2 préparations a été ajouté goutte à goutte sur les cellules 293T dans le flacon. La transfection s'est effectuée durant 4 heures à 37°C et 5% CO₂. Après cette incubation, le milieu de culture a été retiré et remplacé par 7 mL de milieu de culture des cellules 293T, le milieu DMEM. Le flacon de cellules a été incubé 2 jours à 37°C et 5% CO₂. Le recueil du virus a été fait au jour 4. Pour ce faire, le milieu de culture contenant les lentivirus en suspension a été recueilli et filtré à l'aide d'une seringue (BD Falcon, Bedford, MA) de 10 mL et d'un filtre de 0.45 µm (Pall Corporation, Ville St-Laurent, Québec). La suspension de lentivirus a été aliquotée et congelée à -80 °C.

16. Infection de cellules par les lentivirus et sélection des cellules transduites

Préalablement à l'infection, les cellules à infecter (OVCAR-3 et SKOV3) ont étéensemencées dans des plaques 6-puits (BD Falcon, Bedford, MA) afin d'obtenir une confluence d'environ 90% le jour de l'infection. Lors de chaque infection de cellules, 5 puits d'une plaque 6-puits ont été traités : 1 puits infecté avec pLenti-GFP (pour connaître l'efficacité d'infection), 1 puits non-infecté (pour suivre la sélection des cellules) et 3 puits infectés avec le même lentivirus (pour obtenir plusieurs populations stables indépendantes). Au jour 1, les aliquots de lentivirus ont été rapidement dégelés dans un bain à 37 °C. Du polybrène frais (Sigma, St-Louis, Missouri) a été ajouté aux aliquots de lentivirus pour obtenir une concentration finale de 4 µg/mL de polybrène. Le polybrène prépare les cellules à l'infection. Le milieu de culture des cellules OVCAR-3 ou SKOV3 à infecter a été retiré et 700 µL de suspension virale/polybrène par puits ont été ajoutés. Les plaques ont été incubées pour 1 heure à 37°C et 5% CO₂. Après l'incubation, du milieu de culture contenant 4 µg/mL de polybrène pour un volume final de 2 mL par puits a été ajouté et l'incubation s'est poursuivie pour 2 jours. Au jour 3, la suspension virale a été retirée et remplacée par du milieu de culture (RPMI-1640 pour OVCAR-3 et DMEM/F12 pour SKOV3) complet contenant l'antibiotique blasticidine S (CN Biosciences, San Diego, CA) à une concentration de 1 µg/mL pour les cellules OVCAR-3 et de 2 µg/mL pour les cellules SKOV3 (concentrations préalablement déterminées par des tests de sensibilité à la blasticidine). Le milieu de culture contenant la blasticidine était remplacé à tous les 3 jours. Après 10 jours de sélection, le puits contenant les cellules non-infectées ne contenait plus de cellules vivantes tandis que les cellules infectées résistantes à la blasticidine ont été amplifiées à partir de ce

moment. Elles ont été cultivées constamment en présence de blasticidine et ont subi par la suite des passages cellulaires les diluant 1 :3 tous les 3-4 jours.

17. Isolation d'ARN

Les cellules ont été rincées avec du PBS et 1 mL de Trizol (Invitrogen Life Technology, Burlington, Ontario, Canada) a été ajouté au flacon de cellules. Les cellules ont été recueillies à l'aide d'un grattoir stérile et placées dans un tube stérile et ARNase free. La suspension de cellules a été vortexée et incubée 5 minutes à la température de la pièce. 200 μ L de chloroforme ont été ajoutés au tube suivi d'une agitation de 20 secondes et d'une incubation de 10 minutes à la température de la pièce. Les échantillons ont été centrifugés durant 15 minutes à 13 000 RPM à 4°C et la phase aqueuse (phase supérieure) a été transférée dans un nouveau tube ARNase free. Une seconde extraction a été faite en ajoutant 500 μ L de chloroforme au tube, en l'agitant et en le centrifugeant quelques secondes pour séparer les phases. La phase supérieure a été transférée dans un nouveau tube ARNase free. De l'isopropanol (500 μ L) a été ajouté, le tube a été agité 20 secondes, incubé 5 minutes à la température de la pièce et centrifugé 10 minutes à 13 000 RPM à 4°C. Le surnageant a été retiré et le culot d'ARNm a été lavé avec 900 μ L d'éthanol 75%, centrifugé 5 minutes à 13 000 RPM à 4°C. Le surnageant a été enlevé et le culot a été séché pour ensuite être resuspendu dans 25 μ L d'eau stérile ARNses free. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 10 minutes à 65°C et remis à 4°C immédiatement après et conservés à -80°C pour usage ultérieur.

18. RT-PCR

Après dosage de l'ARNm et vérification de la qualité de l'ARNm sur gel d'agarose, 2 μg d'ARNm et 1 μg d'amorce Oligo dT (Promega, Madison, WI, Etats-Unis) ont été mélangés et le volume de réaction a été complété à 15 μL avec de l'eau stérile ARNase free. Le mélange a été incubé durant 5 minutes à 70°C puis mis sur glace pour 5 minutes. Dans l'ordre, les composantes de la réaction de transcription inverse ont été ajoutées : 3 μL d'eau ARNase free, 5 μL de tampon AMVRT 5X (Promega, Madison, WI, Etats-Unis), 2 μL dNTP 25 mM (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada) et 4,5 μL enzyme MmuLV reverse transcriptase 20 U/ μL (produite par Catherine Desrosiers, Départ. Microbiologie). La réaction a été incubée à 42°C pour 1 heure. Afin d'amplifier l'ADNc recherché (domaines de CA125), la réaction suivante a été préparée : 2 μL d'ADNc produit, 5 μL de tampon Pfu Ultra 10X (Stratagen, La Jolla, CA, États-Unis), 0,4 μL de dNTP 25 mM (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada), 0,8 μL de chacune des deux amorces spécifique au IgK leader en 5' et à l'étiquette c-myc en 3' (couple d'amorce # 8 du tableau 2) préalablement diluées à une concentration de 50 nmoles/mL et de l'eau pour compléter le volume à 49 μL . Les produits de PCR ont ensuite été visualisés sur gel d'agarose pour vérifier l'expression des protéines recombinantes dans les populations stables.

19. Récolte de milieu conditionné

Les cellules en culture dans les T-75 ont poussé jusqu'à confluence. Les cellules ont été rincées avec 5 mL de PBS et 10 mL de milieu contenant tous les ajouts sauf le sérum ont été ajoutés au flacon de cellules. Les cellules ont été incubées à 37 °C en présence de 5% CO₂

durant 3 jours. Le milieu de culture conditionné a été récolté dans un tube conique de 15 mL et centrifugé à 1000 RPM pour 5 minutes afin de culoter les cellules en suspension et les cellules mortes. Le surnageant a été conservé à 4 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

20. Dosage biochimique de CA125 dans le milieu de culture conditionné

Le milieu de culture conditionné a subi un ELISA de type sandwich utilisant les anticorps monoclonaux OC125 et M11 dirigés contre des épitopes situés dans le domaine des répétitions de CA125. Le nom de l'essai est ADVIA Centaur® CA125 II assay et a été réalisé grâce à l'appareil nommé analyseur ADVIA Centaur automatisé (Bayer's Corporation).

21. Lyse cellulaire

Les cellules cultivées dans des T-75 ont été lysées selon deux procédures, l'une permettant d'obtenir une concentration plus grande en protéines que l'autre. D'abord, les cellules sont lavées avec 5 mL de PBS puis incubées avec 700 µL de tampon de lyse (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA (Sigma, St-Louis, Missouri), 1% Triton X-100 (ICN Biomedicals, Solon, OH)). Au tampon de lyse a été préalablement ajouté les inhibiteurs de protéases AEBSF 1 µg/ml (Sigma, St-Louis, Missouri), 1 µg/ml leupeptine (Sigma, St-Louis, Missouri), 20 µg/ml aprotinine (Sigma, St-Louis, Missouri), 0,7 µg/ml pepstatine A (Sigma, St-Louis, Missouri). Lorsqu'une concentration protéique plus élevée était requise, les cellules étaient décollées comme lors d'un passage cellulaire puis lavées avec 5 mL de PBS. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 1000 RPM durant 5 minutes et le culot de cellules

resuspendu dans 350 μ L de tampon de lyse. L'incubation dans le tampon de lyse dans les deux méthodes s'est effectuée durant 20 minutes à 4°C avec agitation. Les cellules ont ensuite été récoltées à l'aide d'un grattoir (Starstedt, Newton, NC) et centrifugées à 13000 RPM durant 10 minutes ou centrifugées directement dans le cas des cellules décollées. Le surnageant (lysate cellulaire) a été utilisé immédiatement ou conservé à -20°C pour usage ultérieur.

22. Purification des protéines recombinantes poly-His par colonne de nickel

La purification des protéines recombinantes membranaires et sécrétées dans le milieu conditionné a commencé d'abord par la lyse cellulaire ou la récolte de milieu conditionné. Dans le cas des lysats cellulaires, les cellules à confluence dans une T-75 ont été rincées 2 fois avec du PBS. 700 μ L de tampon de lyse pour colonne de Ni (10 mM imidazole (Bioshop, Burlington, Ontario), 10 mM Tris-HCl pH 7.3, 0.3 M NaCl, 10 mM MgCl₂ (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), 0.5% NP-40 (Roche diagnostics, Indianapolis, IN)) ont été ajoutés et les cellules ont été incubées durant 20 minutes sous agitation à 4°C. Les cellules ont ensuite été récoltées à l'aide d'un grattoir et centrifugées à 13000 RPM durant 10 minutes. Le surnageant (lysate cellulaire) a été conservé pour purification par une microcolonne de Ni (200 μ L de résine). Le milieu conditionné, quant à lui, a été utilisé directement. Les protéines des lysats ont été dosées et 1 mg de protéines total a été utilisé. La résine Ni-NTA agarose (Qiagen, Mississauga, Canada) ont été ajoutés au lysat. Dans le cas du milieu conditionné, 500 μ L de résine Ni-NTA agarose ont été ajoutés aux 10 mL de milieu additionné de 2 mL de tampon de lyse pour colonne de Ni. L'incubation des protéines et de la résine a été faite durant 2 heures à 4°C avec rotation des tubes. Durant l'incubation, la colonne de 5 mL (Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA) a été équilibrée avec 1 mL de tampon de lyse pour colonne de Ni. Après l'incubation, le mélange lysat ou milieu / résine Ni-NTA agarose a été transféré dans la colonne équilibrée et le « flowthrough » a été récolté en une seule fraction. Un lavage de la résine a été fait en faisant passer 1 mL de tampon de lavage (20 mM imidazole, 50 mM Na_2HPO_4 , 0.3 M NaCl, 0.05% Tween 20 (Merck KgaA, Darmstadt, Allemagne), pH 8.0) et a été recueilli en une seule fraction. L'élution de la colonne a été faite en ajoutant 750 μL de tampon d'élution (250 mM imidazole, 50 mM Na_2HPO_4 , 0.3 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0) et en répétant une seconde fois cette même étape (donc 2 fractions d'élution de 750 μL). Les échantillons recueillis ont été conservés à -20°C pour usage ultérieur.

23. Immunoprécipitation

Les protéines des lysats cellulaires ont été dosées par la méthode de Bradford. Les protéines des milieux de culture conditionnés n'ont pas été dosées car les constituants du milieu de culture peuvent interférer avec les protéines produites par les cellules. Toutes les manipulations effectuées avec les lysats et les milieux de culture conditionnés ont été faites à 4°C . Dans le cas des lysats cellulaires, 1 mg de protéines dilué dans du tampon de lyse pour obtenir une concentration finale de 1 mg/mL de protéines était utilisé pour l'immunoprécipitation. Pour les milieux de culture conditionnés, 9 mL de milieu ont été utilisés et 1 mL de tampon de lyse a été ajouté. Aux lysats ou milieux de culture ont été ajoutés 2 μg d'anticorps (voir tableau 5) dirigés contre la protéine à immunoprécipiter ou contre une étiquette. Les mélanges ont été incubés toute la nuit à 4°C avec rotation des tubes. 50 μL d'un mélange 50% billes G-agarose (Upstate, Lake Placid, NY) préalablement lavées 3 fois et resuspendues dans le tampon de lyse ont été ajoutés aux mélanges lysats ou milieu

conditionné avec anticorps. Les échantillons ont ensuite été incubés avec rotation durant 2 heures à 4°C. Les tubes ont été brièvement centrifugés et le surnageant retiré. À une température de 4°C, les billes ont été lavées 5 fois avec 500 μ L de tampon de lyse en centrifugeant brièvement et en retirant le surnageant ensuite. Après le dernier lavage, les billes ont été recentrifugées et le reste de surnageant a été retiré. Les billes ont été resuspendues dans 50 μ L de tampon d'échantillon SDS-PAGE pour chargement (250 mM Tris pH 6.8, 5% (p/v) SDS, 50% (v/v) glycérol, 715 mM β -mercaptoéthanol (Sigma, St-Louis, Missouri), rouge de phénol permettant de visualiser le chargement sur le gel). Les échantillons ont été chauffés à 95 °C durant 5 minutes et chargés sur gel SDS-PAGE.

24. Gel SDS-PAGE et immunobuvardage de type western

Un gel d'acrylamide constitué d'un gel séparateur concentré à 7,5 ou 10% dépendant de l'expérience et d'un gel concentrateur concentré à 4% a été fabriqué. Le tampon d'échantillon SDS-PAGE 4X a été ajouté aux échantillons et ceux-ci ont été chargés dans les puits du gel. La migration des protéines dans le gel a été faite à 150V durant 1 heure dans un tampon de migration pH 8.3 (250 mM Tris, 2M glycine, 1% (p/v) SDS). Le buvardage a été fait par transfert des protéines sur membrane de PVDF (Roche diagnostics, Indianapolis, IN) sous un courant de 300 mA durant 1h30 à 4°C dans un tampon de transfert (20% méthanol, 25 mM Tris et 192 mM glycine). La membrane a été retirée du transfert et incubée à la température de la pièce durant une heure dans un tampon de blocage (5% lait (Biorad, Hercules, CA)) dans du PBS 1X/0.01% Tween 20). L'anticorps primaire a ensuite été dilué de façon appropriée (voir tableau 5) dans le tampon de blocage et la membrane a été incubée à 4 °C avec agitation durant toute la nuit. Le lendemain, la membrane a été lavée 3 fois 15 minutes

dans du PBS 1X/0.01% Tween 20. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxidase (voir tableau 5) dilué dans la solution de blocage durant 45 minutes à température ambiante. La membrane a été lavée 3 fois 15 minutes dans du PBS 1X/0.01% Tween 20. La révélation de la membrane a finalement été faite à l'aide du réactif ECL PLUS (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Angleterre) suivant les instructions du fabricant.

25. Immunofluorescence indirecte sur lame

Les cellules cultivées en T-75 et à une confluence d'environ 80% ont été trypsinisées et comptées. 100 000 cellules ont étéensemencées dans un puits d'une lame labteck (BD Falcon, Bedford, MA) et incubées à 37°C et 5% CO₂ pour la nuit. Le lendemain, les cellules ont atteint une confluence d'environ 80-90% dans les puits. Les cellules ont été rincées rapidement 2 fois avec du PBS 1X pH 7.4. Les lames ont ensuite été fixées dans une solution de formaldéhyde 3.7% faite dans du PBS 1X à 4 °C durant 15 minutes. Les cellules ont été lavées 1 fois dans du PBS 1X durant 10 minutes à température de la pièce sur une plaque agitatrice. Les lames ont été incubées dans une solution de quenching (glycine 0.1M dans le PBS 1X) durant 30 minutes à la température de la pièce. Les cellules ont été perméabilisées ou non dépendant de l'expérience dans une solution 0.2% triton / PBS 1X durant 20 minutes à la température de la pièce. Des lavages de 10 minutes ont été faits sur plaque agitatrice à la température de la pièce avec du PBS 1X. Les lames ont ensuite été incubées 1 heure dans la solution de blocage (2% BSA / PBS 1X). L'anticorps primaire a été dilué dans la solution de blocage selon sa dilution appropriée (voir tableau 5) et la solution d'anticorps a été mise dans les puits des lames. L'incubation avec l'anticorps a été d'une durée d'une heure à la

température de la pièce. Les lames ont ensuite été lavées 2 fois 10 minutes dans du PBS 1X sur une plaque agitatrice à la température de la pièce. De la même façon que l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire a été dilué et placé dans les puits des lames. À partir de cette étape, les manipulations ont toutes été faites dans le noir. L'incubation avec l'anticorps secondaire a duré 1 heure dans une chambre humide à la température de la pièce. Des lavages de 10 minutes ont été faits avec du PBS 1X. L'ADN des noyaux des cellules ont été marqués au DAPI (Roche, Mississauga, Ontario) dilué dans la solution de blocage à une concentration finale de 1 $\mu\text{g/mL}$. Un dernier lavage des cellules a été fait dans du PBS 1X pour 10 minutes sur plaque agitatrice. Les puits ont été retirés de la lame et l'excédent de liquide a été enlevé. Une goutte de milieu de montage (100 mg p-phénylènediamine dissout dans 10 mL PBS 1X, pH ajusté à 9 et 90 mL glycérol ajouté et aliquots conservés à -80°C) a été déposée sur une lamelle (VWR, Montréal, Canada) elle-même ensuite déposée sur la lame. Pour éviter que la lamelle ne glisse de la lame, le montage lame/lamelle a été emballé dans un mouchoir et pressé afin de bien les coller et enlever le surplus de milieu de montage. Les lames ont ensuite été analysées à l'aide de l'objectif 100X d'un microscope à fluorescence Olympus 1X70 (Olympus, Hamburg, Allemagne).

Tableau 5 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés et conditions d'utilisation.

Anticorps	Compagnie	Dilution pour immuno-buvardage de type western	Dilution pour immuno-fluorescence	Dilution pour cytométrie de flux
Anti-CA125 clone M11 (souris)	DAKO, Carpinteria, CA	1 :1000	1 :500	-
Anti-CA125 (VK8 purifié à partir de l'hybridome) (souris)	---	1 :10	-	1 :1
Anti-c-myc tag clone 9B11 (souris)	Cell Signalling Technology, Danvers, MA	1 :1000	-	-
Anti-c-myc tag (souris)	Bioshop, Burlington, Ontario	1 :200	1 :200	-
Anti-mésothéline MN et MB	---	1 :20	-	1 :20
Anti-souris IgG couplé à HRP	Amersham Biosciences, Angleterre	1 :10 000	-	-
Anti-souris IgG couplé à Oregon Green	Molecular Probes, Eugene, Oregon	-	1 :1200	-
Anti-souris IgG couplé à HRP	Pierce, Rockford, IL	1 :20 000	-	-
Anti-souris et anti-lapin couplés à FITC	Pierce, Rockford, IL	-	-	1 :1000

26. Formation de colonies en milieu semi-solide (sans ancrage)

Cet essai a été réalisé en plaques 6-puits. Pour la préparation d'une plaque, 4 mL d'agar 1.33% (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) fondu au micro-ondes et encore très chaud a été mélangé avec 4 mL de milieu DMEM/F12 2X (2 fois plus concentré) complet. Environ 1 mL de cette préparation d'agar maintenant concentré à 0.66% a été versée dans chacun des puits de la plaque. On a laissé reposer la plaque à température ambiante afin de faire solidifier l'agar. Pendant ce temps, les cellules ont été décollées à l'aide de trypsine et récoltées avec du

milieu complet, centrifugées et resuspendues dans du milieu DMEM/F12 2X. Le décompte des cellules a été fait et 15000 cellules ont été prélevées et le volume a été complété à 1.5 mL avec du milieu DMEM/F12 2X. Le même volume d'agar 0.66% fondu et à 37°C a été ajouté à la suspension de cellules et bien mélangé. 1 mL de cette suspension de cellules (donc 5000 cellules) a été déposé dans les puits par-dessus la première couche d'agar. Cette couche a solidifié durant quelques minutes et 2 mL de milieu complet a ensuite été ajouté afin de fournir les nutriments aux cellules et éviter que l'agar ne sèche. Les plaques ont été incubées durant 30 jours à 37°C et 5% CO₂ et le milieu a été changé à toutes les semaines. La formation de colonies a été observée après 30 jours avec les objectifs 4X et 10X d'un microscope inversé (Nikon Eclipse TS100). Des photos ont été prises et les colonies ont été dénombrées.

27. Formation de foyers post-confluence

Les cellules ont été décollées avec la trypsine et récoltées, puis dénombrées et resuspendues de manière à obtenir une concentration de 350 000 cellules / 2 mL de milieu complet. Cette suspension cellulaire a étéensemencées en triplicatas dans des plaques 6-puits. Les plaques ont été observées à chaque jour et le jour de l'atteinte de la confluence (100%) a été déterminé comme le jour 0. Des photos des cellules ont été prises aux jours 0, 3 et 7.

28. Courbes de croissance

Les cellules ont été trypsinisées et récoltées, puis dénombrées et resuspendues de manière à obtenir une concentration de 100 000 cellules / 2 mL de milieu complet. Cette suspension

cellulaire a été ensemencées dans chacun des puits de 5 plaques 6-puits. À chaque 24h durant 9 jours, les cellules ont été récoltées des puits (triplicatas) et resuspendues dans un volume de milieu approprié au décompte des cellules. Un volume de 30 μL de la suspension a été prélevée et mélangée à 10 μL de bleu de trypan (Sigma, St-Louis, Missouri) puis le décompte des cellules vivantes a été fait.

29. Formation de sphéroïdes par goutte inversée

Les cellules ont d'abord été décollées avec 0.53 mM EDTA (Wisent Inc, St-Bruno, Québec) pour éviter que les molécules de surface cellulaires ne soient endommagées par la trypsine. Les cellules ont été lavées avec 5 mL de milieu complet, resuspendues dans un volume approprié de milieu et dénombrées. Les cellules ont été diluées pour atteindre une concentration de 4000 cellules / 15 μL . Des gouttes de 15 μL de suspension cellulaire ont été déposées dans le couvercle d'un pétri 10 cm. Le couvercle a alors été retourné délicatement sur le fond de la boîte de pétri contenant 15 mL de PBS afin de conserver l'humidité et ainsi éviter que les gouttes ne sèchent. Les pétris ont été incubés à 37°C et 5% CO_2 . La formation de sphéroïdes a été suivie à chaque jour en prenant des photos à l'aide de l'objectif 10X du microscope.

30. Clonogénicité sur plastique

Les cellules ont été ensemencées à faible densité dans des plaques 6-puits, c'est-à-dire 100, 250 et 500 cellules par puits, chaque nombre de cellules en duplicata. Les cellules ont été incubées à 37°C et 5% CO_2 et le milieu a été changé une fois par semaine. Après 10 jours

d'incubation, les puits ont été lavés au PBS et les cellules fixées au méthanol durant 10 minutes à -20 °C. Les cellules ont été colorées au crystal violet (Aldrich chemicals, Milwaukee, WI) 1% / 70% éthanol durant 15 minutes. Les puits ont ensuite été lavés 2 fois à l'eau et des photos ont été prises.

31. Essai de migration par blessure de la monocouche de cellules

Les cellules utilisées pour cet essai ont été ensemencées dans des plaques 6-puits et une confluence de 100% a été atteinte. Une blessure de la monocouche de cellules a été faite en traçant dans le fond du puits une croix à l'aide d'un embout de micropipette de 200 µL. Les puits ont ensuite été lavés 2 fois avec du PBS. 2 mL de milieu complet additionné de 75 mM d'hydroxyurée permettant de bloquer la prolifération des cellules ont été ajoutés aux puits. Les plaques ont été ensuite incubées à 37°C et 5% CO₂. Des photos des puits ont été prises après 6 et 24 heures pour observer la migration des cellules dans l'espace créé par la blessure.

RÉSULTATS

D'après les observations faites par le passé dans notre laboratoire et certains résultats démontrés dans la littérature, le domaine extracellulaire de CA125 semble avoir des rôles à jouer dans le développement, la tumorigénicité et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses de l'ovaire.

L'influence du domaine extracellulaire de CA125 sur des composantes de son microenvironnement, c'est-à-dire les cellules mésothéliales bordant la cavité intrapéritonéale et les lymphocytes présents dans l'ascite, a été étudiée à l'aide de cellules exprimant CA125 à leur surface et de CA125 présent dans le milieu conditionné et dans l'ascites suite au clivage de la portion extracellulaire.

Des populations stables exprimant les différentes parties du domaine extracellulaire de CA125 serviront à vérifier l'influence de ces domaines sur la tumorigénicité et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses.

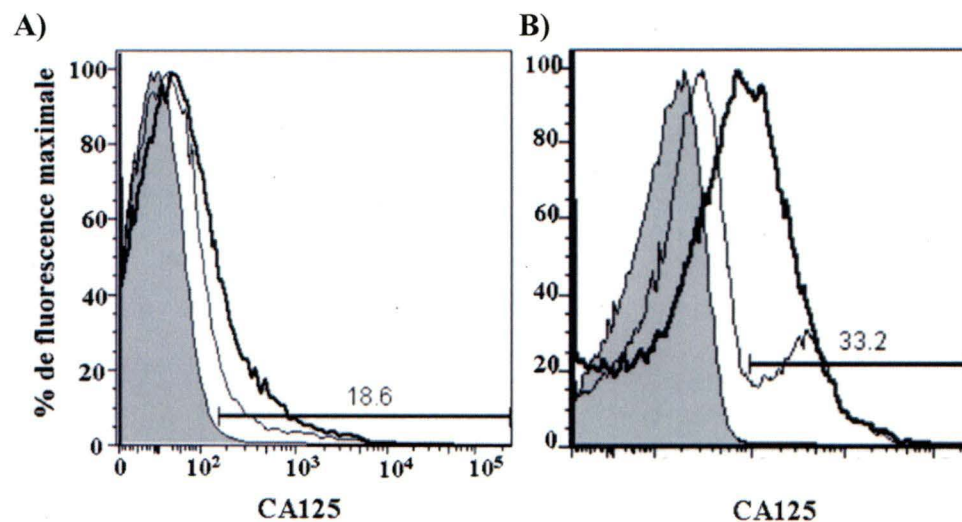
32. Détermination de la présence de CA125 à la surface des lymphocytes

Selon notre hypothèse, le domaine extracellulaire de CA125 pourrait être impliqué dans la tumorigénicité et le développement du cancer épithélial de l'ovaire. Le microenvironnement dans lequel se trouvent les cellules épithéliales cancéreuses de l'ovaire comprend des lymphocytes et les cellules cancéreuses doivent acquérir certaines caractéristiques pour échapper au système immunitaire. Afin de vérifier si la présence de CA125 dans ce microenvironnement influence les lymphocytes ou vice versa, différents tests ont été réalisés.

D'abord, des lymphocytes de donneurs en santé ont été isolés du sang et incubés durant 72 heures dans l'ascite d'une patiente (ascite CA125-positif). Parallèlement, des lymphocytes de patientes de cancer épithélial de l'ovaire (lymphocytes du sang et du liquide péritonéal) ont aussi été isolés. Les lymphocytes ont été analysés par cytométrie de flux en utilisant un anticorps anti-CA125 pour déterminer s'il y avait présence de CA125 à la surface de ces lymphocytes. La figure 11 A) indique la présence de CA125 à la surface des lymphocytes de donneurs normaux (ligne épaisse : donneur #1, ligne fine : donneur #2) par une augmentation de la fluorescence pour CA125 comparativement au contrôle isotypique (zone ombragée). En B) on observe le même phénomène, c'est-à-dire que les lymphocytes du sang périphérique (ligne épaisse) et les lymphocytes du liquide péritonéal (ligne fine) montrent une fluorescence plus importante pour CA125 que le contrôle isotypique. C'est donc dire que l'on retrouve du CA125 à la surface des lymphocytes ayant été en présence de CA125. Il est à noter qu'il semble y avoir deux populations de lymphocytes du liquide péritonéal (deux pics).

Figure 11 : Détermination de la présence de CA125 à la surface de lymphocytes ayant été en présence de CA125.

Les lymphocytes des donneurs sains #1 et #2 ont été mis dans l'ascite de patiente de cancer ovarien durant 72 heures puis incubés avec les anticorps VK-8 et anti-souris couplé à FITC pour être ensuite analysés par cytométrie de flux (A). Les lymphocytes du sang périphérique et du liquide péritonéal d'une patiente ont également été analysés de la même manière (B). Légende : (A) ligne épaisse = donneur #1, ligne fine = donneur #2, (B) ligne épaisse = lymphocytes du sang périphérique, ligne fine = lymphocytes du liquide péritonéal.



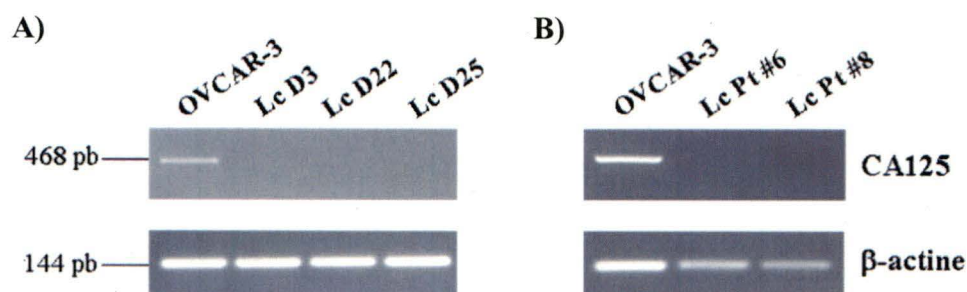
33. Expression de CA125 par les lymphocytes ayant été en présence de CA125

La figure 11 suggère deux explications potentielles : soit les lymphocytes ayant été incubés avec du CA125 se sont mis à l'exprimer à leur surface, soit du CA125 présent dans l'ascite et le sang s'est lié à leur surface cellulaire. Afin de vérifier la première hypothèse, l'ARN des lymphocytes traités 72h dans l'ascite (donneurs #3, #22 et #25) et des lymphocytes des patientes #6 et #8 a été isolé. Une réaction de RT-PCR a été faite sur cet ARNm avec des amorces spécifiques au domaine des répétitions de CA125. Une réaction de RT-PCR à partir de l'ARN de cellules NIH :OVCAR-3 a été utilisé comme contrôle positif pour l'expression

de CA125. Des amorces spécifiques à la β -actine ont été utilisées pour une réaction de RT-PCR sur chacun des échantillons d'ARN comme contrôle interne de quantité. La figure 12 montre que les lymphocytes qui ont été incubés 72 heures dans l'ascite (A) aussi bien que les lymphocytes de patientes (B) n'expriment pas CA125 et suggère alors que le CA125 s'est bien lié à la surface des lymphocytes.

Figure 12 : Expression de CA125 par les lymphocytes de donneurs sains incubés dans l'ascites et les lymphocytes de patientes.

L'ARN des lymphocytes de donneurs sains incubés 72 heures dans l'ascites (A) et des lymphocytes de patientes de cancer de l'ovaire (B) a été isolé et une réaction de RT-PCR avec des amorces spécifiques aux répétitions de CA125 a été faite. La même expérience a été réalisée avec l'ARN des cellules OVCAR-3 (contrôle positif). Les produits de PCR ont été mis sur gel selon la même quantité tel que confirmé par le contrôle interne d'actine. Légende : Lc = lymphocytes, Pt = patiente.



34. Sensibilité des cellules tumorales aux cellules NK

Des essais de sensibilité à la lyse par les cellules NK ont été faits avec les clones CA125-knockdown dérivés de la lignée de cancer de l'ovaire NIH : OVCAR-3. Cette lignée est

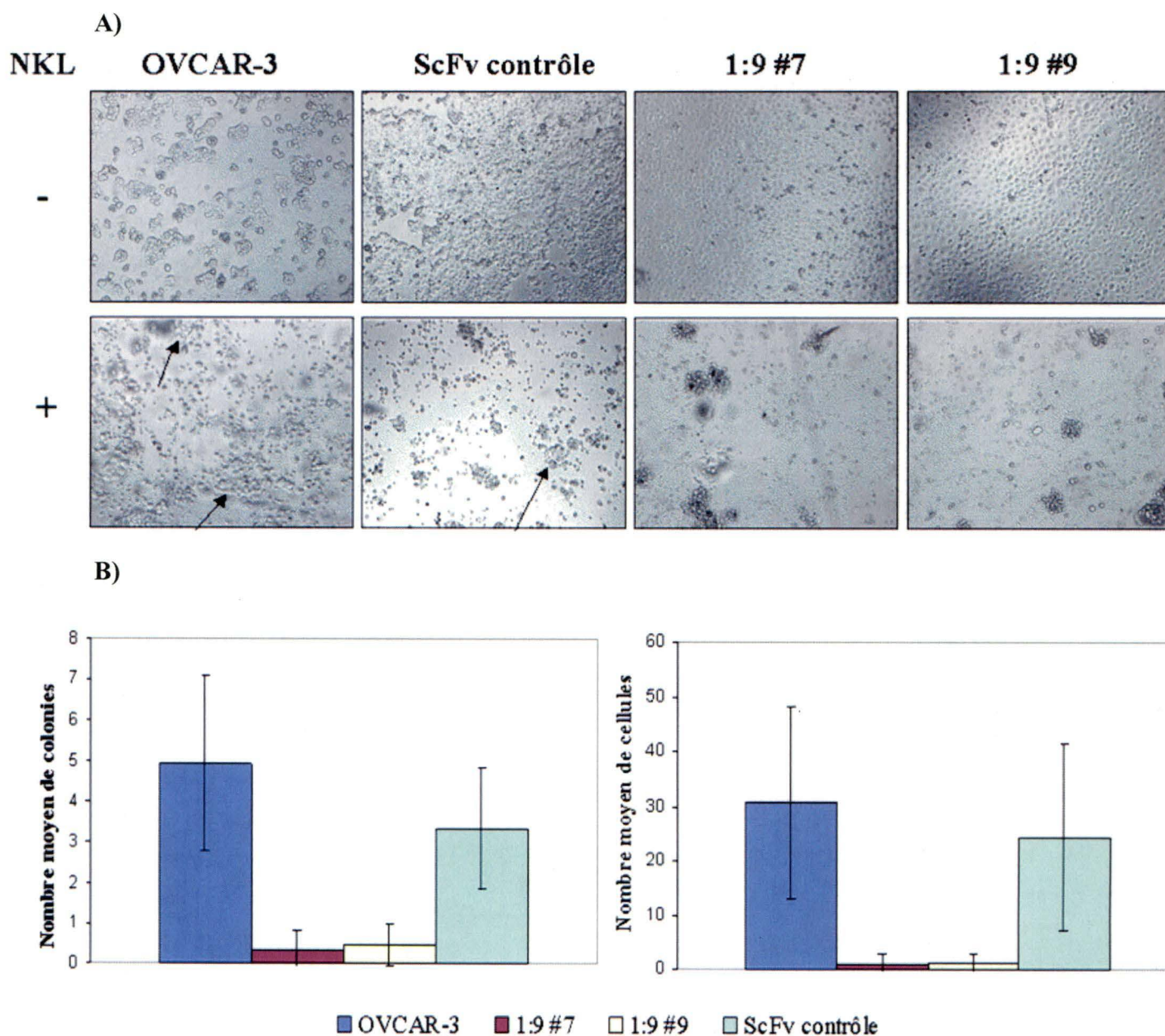
sensible à la lyse par les cellules NK mais ces essais ont été effectués dans le but de savoir si la perte de CA125 à la surface des cellules affecte cette sensibilité aux cellules NK.

La lignée cellulaire NKL a été utilisée comme cellules effectrices. Les cellules cibles sont les clones CA125-knockdown 1 :9 #9, 1 :9 #7 ainsi que le clone scFv contrôle et la lignée parentale OVCAR-3. Les cellules cibles ont étéensemencées et lorsqu'elles ont été adhérees aux puits, les cellules NKL ont été ajoutées à la culture dans un ratio cellules cibles : cellules effectrices de 1 :1. Après 72 heures de co-culture, les cellules NK avaient lysé une bonne proportion des cellules mais les colonies de cellules résistantes pour chaque lignée ont pu être dénombrées. Les résultats ont aussi été portés en histogrammes.

La figure 13 A) montre qu'on retrouve plus de cellules résistantes à la lyse par les cellules NKL chez les cellules exprimant CA125 à leur surface, c'est-à-dire les OVCAR-3 et scFv contrôle. C'est ce que la figure 13 B) semble suggérer également et ce, de façon significative selon le test statistique de Student effectué ($p < 0,05$). Ces résultats suggèrent que les cellules n'exprimant pas CA125 sont significativement plus sensibles à la lyse par les cellules NKL que les cellules qui l'expriment à leur surface. CA125 agirait donc comme protection des cellules tumorales contre les cellules NK.

Figure 13 : Sensibilité des cellules CA125-knockdown à la lyse par les cellules NKL.

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 12-puits à raison de 250 000 cellules par puits et chaque lignée en triplicatas. Les cellules NKL ont été ajouté dans un ratio cellules effectrices :cellules cibles de 1 :1 à chaque puits 24 heures plus tard. (A) Après 72 heures de co-culture des deux lignées cellulaires, des photos ont été prises, (B) les cellules vivantes et les colonies de cellules ont été dénombrées dans 5 champs de microscope déterminés aléatoirement pour chacun des 3 puits de chaque lignée ($p < 0,05$). Les flèches pointent des îlots de cellules vivantes.

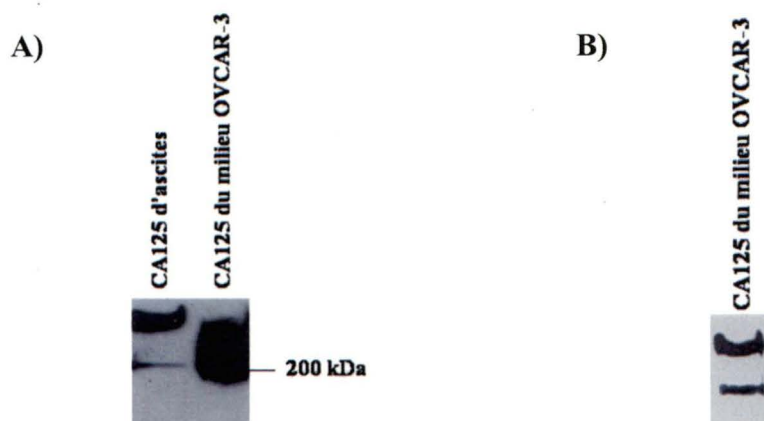


35. Liaison CA125 / mésothéline

Une autre composante du microenvironnement des cellules cancéreuses de l'ovaire est le mésothélium, une monocouche de cellules mésothéliales bordant la cavité intrapéritonéale. CA125 a été démontré comme liant la mésothéline, une protéine exprimée à la surface des cellules mésothéliales (RUMP et al, 2004). Cette étude avait démontré cependant l'interaction entre la mésothéline et un fragment du domaine des répétitions de la mucine CA125. Nous avons voulu ici montrer que CA125 dans sa forme native peut lier la mésothéline. Cette information est importante à connaître puisque l'on sait que l'on retrouve la protéine CA125 dans l'ascite des patientes de cancer ovarien, plus précisément dans la cavité péritonéale. Cette cavité est bordée par une couche de cellules mésothéliales. Du CA125 provenant de milieu de culture conditionné des cellules NIH :OVCAR-3 et d'ascites de patiente a été partiellement purifié selon une méthode décrite dans un article paru en 2003 (WONG et al., 2003). Par une expérience de « western blot overlay », c'est-à-dire en faisant migrer le CA125 provenant des deux sources différentes sur gel SDS-PAGE, en incubant la membrane avec la mésothéline recombinante (Meso-Fc) acquise d'un collaborateur (Ira Pastan, NIH-NCI, Bethesda) et en révélant avec un anticorps anti-mésothéline, on a détecté les bandes typiques de CA125 sur le gel, comme le montre la figure 14 A). Ces bandes ont été comparées à celles obtenues lorsqu'on fait migrer du CA125 provenant de milieu conditionné de cellules OVCAR-3 et en révélant avec un anticorps anti-CA125 (VK8). Cela démontre donc que CA125 dans sa forme native peut lier la mésothéline.

Figure 14 : Liaison des protéines CA125 natives et mésothéline recombinante Meso-Fc.

CA125 partiellement purifié d'ascites de patiente (100 U) et de milieu conditionné de cellules OVCAR-3 (500 U) a subi une électrophorèse SDS-PAGE. La membrane a été incubée avec la molécule Més-Fc puis avec un anticorps anti-mésothéline (MN) (A). CA125 provenant de milieu des cellules OVCAR-3 a aussi été détecté par un anticorps anti-CA125 (VK-8) dans le but de comparer des bandes obtenues (B).



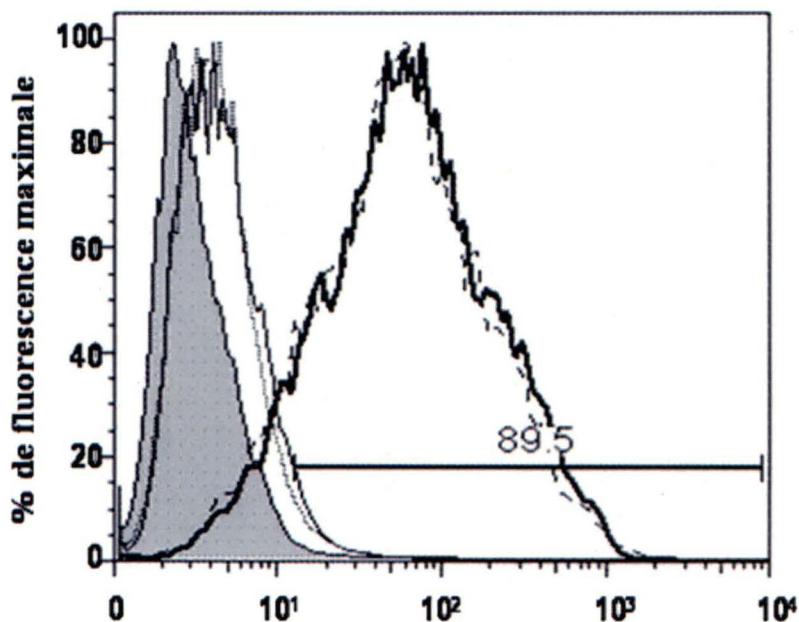
36. Liaison mésothéline / cellules CA125-positives

Une fois les molécules de mésothéline et CA125 montrées comme pouvant se lier, il était intéressant de vérifier si la mésothéline pouvait lier CA125 dans un contexte cellulaire. Les cellules CA125-knockdown 1:9#9 et 1:9#7 ainsi que les cellules exprimant beaucoup de CA125 à leur surface OVCAR-3 (parentale) et scFv contrôle ont été incubées avec la mésothéline recombinante Més-Fc, lavées puis analysées par cytométrie de flux en utilisant un anticorps couplé à FITC dirigé contre la partie Fc de Més-Fc. La figure 15 démontre que la fluorescence observée était beaucoup plus importante chez les cellules exprimant CA125 (parentale OVCAR-3 et scFv contrôle) que chez les cellules CA125-knockdown (1:9#9 et

1 :9#7). Ce résultat suggère que la mésothéline lierait CA125 associé à la membrane cellulaire des cellules cancéreuses de l'ovaire.

Figure 15 : Liaison de la Més-Fc aux cellules CA125-positives.

La Més-Fc a été incubée avec les cellules CA125-knockdown (1 :9#9 et 1 :9#7) et avec les cellules contrôle CA125-positives (la lignée parentale OVCAR-3 et le scFv contrôle). Une expérience de cytométrie de flux utilisant un anticorps secondaire reconnaissant la partie Fc de Més-Fc a été réalisée sur ces cellules. Légende : 1 :9#9, — 1 :9#7, — OVCAR-3, --- scFv contrôle.



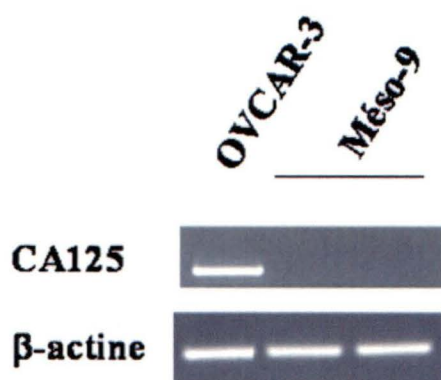
37. Expression de CA125 par les cellules mésothéliales

Avant de vérifier une interaction entre cellules mésothéliales (exprimant la mésothéline) et les cellules exprimant CA125 à leur surface, il fallait d'abord s'assurer de l'absence d'expression de CA125 par les cellules mésothéliales utilisées. Pour ce faire, une réaction de RT-PCR avec

des amorces spécifique à CA125 a été réalisée sur les cellules méso-9. La figure 16 démontre l'absence d'expression de CA125 par les cellules méso-9 contrairement au contrôle positif OVCAR-3. Ces cellules peuvent donc être utilisées pour étudier l'interaction cellules mésothéliales / cellules CA125-positives.

Figure 16 : Expression de CA125 par les cellules Méso-9.

L'ARN des cellules méso-9 a été isolé et une réaction de RT-PCR avec des amorces spécifiques aux répétitions de CA125. La même expérience a été réalisée avec les cellules OVCAR-3 (contrôle positif). Les produits de PCR ont été mis sur gel d'agarose selon la même quantité tel que confirmé par le contrôle interne d'actine.



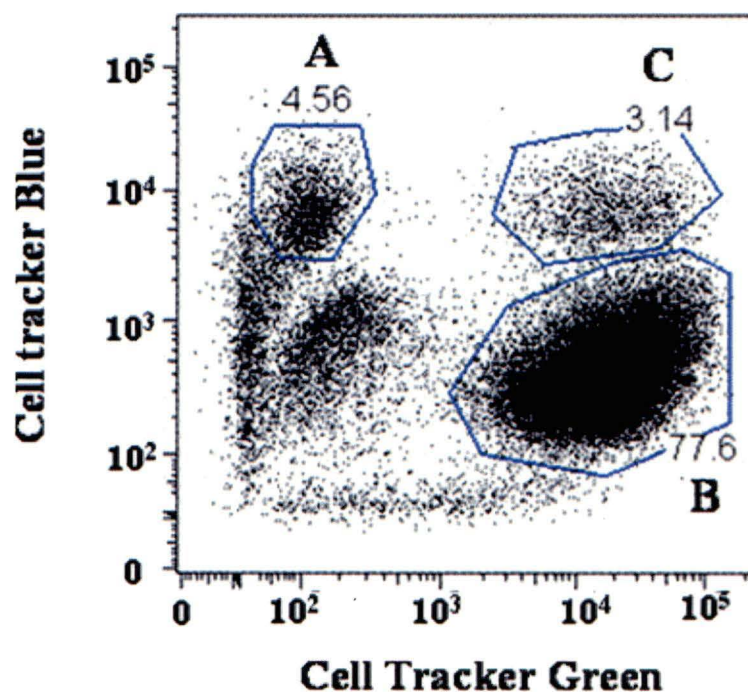
38. Interaction hétérotypique cellules mésothéliales / cellules CA125-positives

L'interaction entre CA125 humain à la surface des cellules OVCAR-3 et la mésothéline exprimée par les cellules de souris LO a été démontrée (RUMP, 2004). Cependant, l'interaction entre CA125 humain et la mésothéline humaine demeurerait encore à vérifier. L'expérience réalisée consistait à colorer des cellules humaines CA125-positives (HTB-30) avec un fluorochrome d'une couleur et les cellules mésothéliales humaines avec un fluorochrome différent. Ensuite, les deux types cellulaires étaient incubés ensemble et la

formation de doublets hétérotypiques a pu être analysée par cytométrie de flux. La figure 17 montre que les cellules HTB-30 ont bien été colorées en bleu (A) et les cellules méso-9, en vert (B). En (C), on peut constater que les cellules possèdent les deux colorations. Cela suggère donc qu'il s'agirait de doublets de cellules HTB-30 / Méso-9 liées entre elles et que cette interaction pourrait être due à la liaison CA125-mésothéline.

Figure 17 : Formation de doublets de cellules CA125-positives / cellules Msn-positives.

Les cellules HTB-30 (CA125-positives) ont été colorées à l'aide du fluorochrome CellTracker Blue (A) et les cellules Méso-9 (mésothéliales) par le CellTracker Green (B). Après une incubation des deux lignées cellulaires, la formation de doublets de cellules fluoresçant bleu et vert (C) a été analysée par cytométrie de flux.

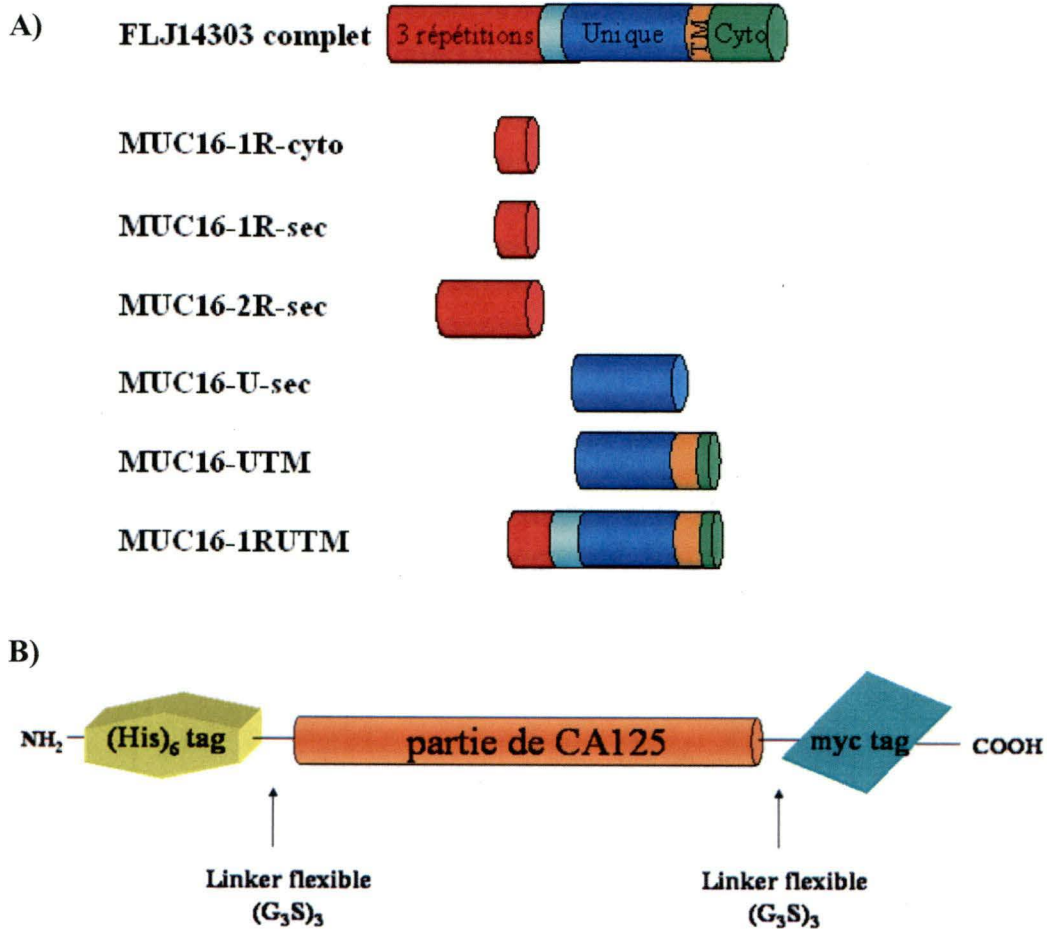


39. Construction des plasmides pour l'expression et la sécrétion des domaines extracellulaires de CA125

Les résultats précédents montrent une implication du domaine extracellulaire de CA125 dans le développement du cancer ovarien (évasion du système immunitaire) et une interaction cellulaire hétérotypique favorisant le potentiel métastatique des cellules cancéreuses. Afin de tenter de découvrir quels domaines de la partie extracellulaire de CA125 sont associés à ces fonctions, différentes constructions ont été faites et sont illustrées à la figure 18 A). L'ADN plasmidique contenant FLJ14303 a été utilisé pour amplifier les différents domaines de la partie extracellulaire de CA125. Les constructions MUC16-1R-sec et MUC16-2R-sec sont respectivement, et comme leur nom l'indique, une et deux répétitions de CA125. MUC16-U-sec représente le domaine unique. Ces trois constructions possèdent un signal de sécrétion IgK leader permettant à la protéine d'entrer dans la voie de sécrétion afin d'être relâchée dans le milieu extracellulaire. Une construction contrôle (la protéine produite sera cytoplasmique car elle ne possède pas de signal de sécrétion) est la construction MUC16-1R-cyto.

Figure 18 : Schématisation des constructions et protéines recombinantes produites.

Les constructions MUC16-1R-sec, MUC16-2R-sec, MUC16-U-sec, MUC16-UTM et MUC16-1RUTM ont été faites à partir de réactions PCR sur l'ADN complémentaire de FLJ14303. MUC16-1R-sec se compose de la première répétition de CA125, MUC16-2R-sec des deux premières, MUC16-U-sec du domaine unique, MUC16-UTM du domaine unique et du domaine transmembranaire (TM) suivi de 3 acides aminés du domaine cytoplasmique et MUC16-1RUTM est identique à MUC16-UTM auquel on a ajouté la première répétition de CA125 (A). Toutes ces constructions ont été faites selon le même patron, c'est-à-dire qu'elles possèdent une étiquette polyhistidine en N-terminal, suivi d'un adaptateur flexible (G_3S)₃ appelé « linker » sur la figure, le domaine de CA125, un second adaptateur flexible séparant ce domaine de l'étiquette c-myc situé en C-terminal de la protéine (B).



Afin de réaliser ces constructions, un premier plasmide contenant les étiquettes séparées des sites de restriction où seront clonés l'ADN des domaines de CA125 par des adaptateurs flexibles et contenant aussi le signal de sécrétion a été d'abord fabriqué. On a ajouté au plasmide pShuttle-CMV ces différents ADN par ligation avec des adaptateurs. À chaque ajout d'un adaptateur, le processus de clonage en entier (ligation, transformation, validation des clones, amplification de l'ADN du clone positif) a été réalisé comme expliqué dans la section Matériel et Méthodes (résultats non montrés). Lorsque le plasmide pShuttle-CMV-Igk-His-myc (plasmide contenant la cassette d'expression voulue) a été prêt, l'ADN des domaines de CA125 ont pu y être clonés. À l'aide du plasmide pME18S-FL3 (GenBank AB009864) contenant la séquence de FLJ14303, les différentes séquences d'ADN nécessaires au clonage ont été amplifiées par PCR. Après avoir obtenu les différents produits de PCR, les clonages ont été effectués afin d'obtenir les constructions pShuttle-CMV-IgK-His-myc-MUC-16-nom du ou des domaines de CA125. Les cassettes d'expression contenant maintenant les ADN recherchés ont ensuite été transférées par une autre étape de clonage complet dans le plasmide pLenti6V5. Les constructions obtenues seront à l'avenir appelées MUC16-1R-sec, MUC16-2R-sec et MUC16-U-sec afin de simplifier la nomenclature. Les détails des différents clonages sont expliqués dans la section Matériel et Méthodes.

40. Production de lentivirus et infection des cellules humaines

Pour chacune des constructions fabriquées, des lentivirus ont été produits. Des cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides pLenti6V5 construits et les trois plasmides apportant les fonctions virales en *trans* pLP1, pLP2 et pLP/VSVG. Une fois les virus produits, les différents milieux de culture contenant les lentivirus ont été recueillis et la transduction de

cellules humaines a pu être possible. Les lentivirus servant à la production de protéines recombinantes sécrétées (MUC16-1R-sec, MUC16-2R-sec, MUC16-U-sec et le contrôle MUC16-1R-cyto) ont été utilisés pour infecter les cellules NIH :OVCAR-3. En effet, les études portant sur l'interaction mésothéline-CA125 et l'interaction cellules immunitaires-CA125 ont été réalisées à l'aide de cette lignée cellulaire et de CA125 produit par celle-ci. Il était donc essentiel de produire des protéines recombinantes à partir de cette lignée afin d'obtenir les différents domaines possédant les mêmes caractéristiques (ex. : modifications post-traductionnelles telles les glycosylations) que dans la protéine endogène. Les cellules ont été infectées avec les différents lentivirus et des populations stables ont été générées. La population stable par rapport au clone stable est hétérogène pour le niveau d'expression et cela compense pour les artéfacts de clonage pouvant se produire dans le cas des clones stables. Par exemple, si quelques cellules en minorité dans la population stable se comportent différemment des autres cellules pour un certain phénotype, ce comportement sera dilué par le comportement majoritaire de la population stable entière et le résultat sera donc plus représentatif du phénotype conféré par le gain de fonction.

Les populations stables ont été générées en infectant les cellules avec les lentivirus. Un lentivirus contenant le plasmide pLenti6V5-GFP (green fluorescent protein) était utilisé comme contrôle d'infection. Le génome viral contenant les domaines de CA125 transféré ainsi aux cellules s'est intégré au génome des cellules. Il y a ensuite eu sélection des cellules infectées par la blasticidine. Un contrôle de cellules non-infectées indiquait à quel moment les cellules qui n'avaient pas été infectées dans les puits expérimentaux étaient toutes tuées par la blasticidine et à quel moment les puits ne contenaient que des cellules ayant été infectées. Les différentes populations stables ont alors été amplifiées.

41. Validation de l'expression des protéines recombinantes et de la fonctionnalité des étiquettes

La validation des populations stables pour l'expression des protéines recombinantes se fait à plusieurs niveaux : validation de l'expression des gènes par RT-PCR et validation de l'expression protéique. Par la suite, la vérification de la fonctionnalité des étiquettes a aussi été vérifiée.

Une première validation des populations stables a été faite par RT-PCR pour valider l'expression des transcrits codant pour les différentes protéines recombinantes. L'ARN total a été extrait des populations stables et la transcription inverse a permis de synthétiser l'ADNc à partir des ARN. Une réaction PCR a ensuite été faite sur les ADNc avec des amorces spécifiques au IgK leader en 5' et à l'étiquette c-myc en 3'. En effet, on ne pouvait utiliser les amorces du clonage des constructions car la lignée OVCAR-3 exprime CA125 de façon endogène. La figure 19 montre l'analyse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR. On peut y voir que les lignées contrôles OVCAR-3 et OVCAR-3-GFP n'expriment pas de protéines recombinantes. Les poids moléculaires attendus pour les ADNc sont bien respectés selon les bandes obtenues en comparaison avec l'échelle de poids moléculaire 1kb DNA ladder. En A), on peut voir que les poids moléculaires des ADNc pour les constructions MUC16-U-sec, -2R-sec et -1R-sec correspondent aux poids théoriques attendus, soit, respectivement, 947 pb, 1225 pb et 739 pb. La figure B) montre l'expression protéique des mêmes constructions. L'analyse cellulaire des différentes constructions suivie d'une purification par colonne de nickel via l'étiquette polyhistidine (située en N-terminal de la protéine) et d'un immunobuvardage utilisant l'anticorps anti-myc dirigé contre l'étiquette c-myc (situé en C-terminal) ont été

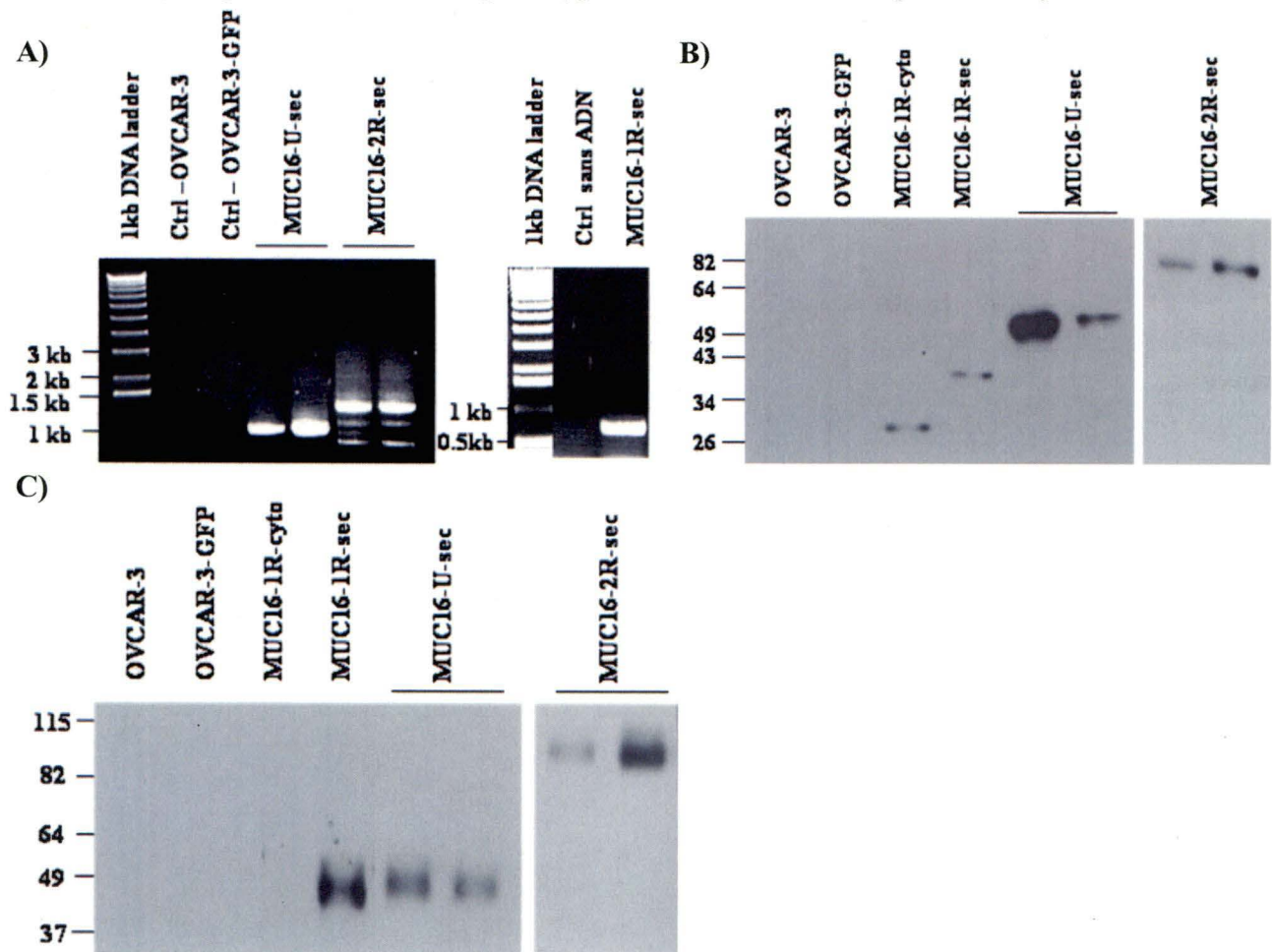
réalisées. Les résultats montrés à la figure C) prouvent non seulement que les protéines recombinantes sont bien exprimées chez les populations stables mais démontrent également la fonctionnalité des deux étiquettes. Les poids moléculaires observés correspondent assez bien aux poids moléculaires déterminés théoriquement selon le nombre d'acides aminés. En effet, dans le cas de la construction MUC16-1R, le poids moléculaire théorique attendu était de 24,4 kDa. On observe à la figure B) une bande à environ 28-30 kDa pour la construction cytoplasmique et 39-40 kDa pour la construction sécrétée. Ces poids moléculaires observés plus élevés s'expliqueraient par la forte glycosylation touchant le domaine des répétitions de CA125. La protéine qui n'est pas sécrétée a pu être modifiée d'une quelconque façon pour obtenir ce poids moléculaire supérieur tandis que la construction sécrétée contenue dans le lysat cellulaire était en cours d'acquisition de modifications (glycosylations) dans la voie de sécrétion. Il en est de même pour les constructions MUC16-U-sec (31,1 kDa) et -2R-sec (42,5 kDa) pour lesquelles on peut observer des poids respectifs d'environ 50-52 et 82 kDa. Quant aux protéines recombinantes sécrétées se trouvant dans le milieu conditionné, elles ont également subi une purification par colonne de nickel avant d'être analysées sur gel SDS-PAGE. À la figure C), on peut constater que les protéines sécrétées ont toutes un poids supérieur à celles exprimées dans les lysats cellulaires, ceci dû à la glycosylation complétée dans la voie de sécrétion. On observe donc des poids d'environ 48 kDa pour MUC16-1R-sec, de 49-50 kDa pour MUC16-U-sec et 105 kDa pour MUC16-2R-sec.

En résumé, la figure 19 montre bien l'expression des protéines recombinantes sécrétées par les populations stables et démontre que les étiquettes utilisées sont fonctionnelles.

Les populations stables dérivées de la lignée parentale OVCAR-3 (MUC16-1R-cyto et -sec, -U-sec et -2R-sec) ont été envoyées à notre collaborateur, l'investigateur principal des deux articles mis en annexe, Dr Manish S. Patankar, afin qu'il poursuive les études entreprises avec lui au sujet de la mésothéline et des lymphocytes.

Figure 19 : Validation de l'expression des protéines recombinantes sécrétées.

Une réaction de RT-PCR a été effectuée avec l'ARN extrait des populations stables OVCAR-3 et les différents domaines de CA125 ont été amplifiés. Les produits de PCR ont été migrés sur gel d'agarose 0.8% (A). Les lysats des populations stables ont été migrés sur gel SDS-PAGE 10% (B). Les protéines sécrétées dans le milieu conditionné ont été purifiées par colonne de Ni et les éluats ont été migrés sur gel SDS-PAGE 10% (C). Les gels en B) et C) ont été analysés par immunobuvardage de type western avec l'anticorps anti-c-myc.



42. Construction des plasmides pour l'expression membranaire des domaines extracellulaires de CA125

Afin de pouvoir vérifier si les phénotypes observés chez les modèles d'études de CA125 du laboratoire (clones knockdown et gain de fonction du CTD) pourraient être dus en tout ou en partie au domaine extracellulaire de CA125, des populations stables exprimant de ces domaines (gain de fonction) ont été faites et sont illustrées à la figure 18 A). Les plasmides utilisés pour générer ces constructions sont les mêmes que pour les protéines sécrétées décrites précédemment. MUC16-UTM et MUC16-1RUTM sont des protéines qui seront ancrées à la membrane plasmique des cellules qui les exprimeront; elles possèdent donc en plus du domaine unique, le domaine transmembranaire et 3 acides aminés chargés positivement du domaine cytoplasmique afin de permettre un bon ancrage à la membrane. Ces constructions d'ADN, lorsque utilisées pour fabriquer des lentivirus pour transduire les cellules humaines choisies, permettront l'expression de domaines de CA125. Ces protéines recombinantes posséderont deux étiquettes, polyhistidine et c-myc, respectivement en N- et en C-terminal de la protéine comme schématisé à la figure 18 B).

43. Production des lentivirus et infection des cellules humaines

Les lentivirus qui permettront l'expression par les cellules humaines transduites ont été fabriqués de la même manière que décrite à la section 40. Dans le cas des protéines recombinantes ancrées à la membrane plasmique (MUC16-UTM et MUC16-1RUTM), les cellules humaines infectées ont été les cellules SKOV3. Les cellules SKOV3 représentaient

les cellules les plus adaptées pour faire un gain de fonction car elles n'expriment pas de CA125 de manière endogène.

44. Validation de l'expression des protéines recombinantes membranaires et de la fonctionnalité des étiquettes

La validation des populations stables exprimant les domaines de CA125 à la membrane a été faite de la même manière que celle des populations stables exprimant les protéines sécrétées, c'est-à-dire par RT-PCR pour valider l'expression des transcrits codant pour les différentes protéines recombinantes puis par analyse des lysats cellulaires pour l'expression protéique.

De la même façon que pour les protéines sécrétées, le RT-PCR a été fait avec les mêmes amorces que pour ces dernières. La figure 20 A) montre que les contrôles négatifs sont bien négatifs. Les poids moléculaires attendus pour les constructions UTM et 1RUTM sont respectivement de 1028 pb et 2801 pb et les bandes observées sur le gel semblent avoir migré selon ces poids comparativement à l'échelle de poids moléculaire.

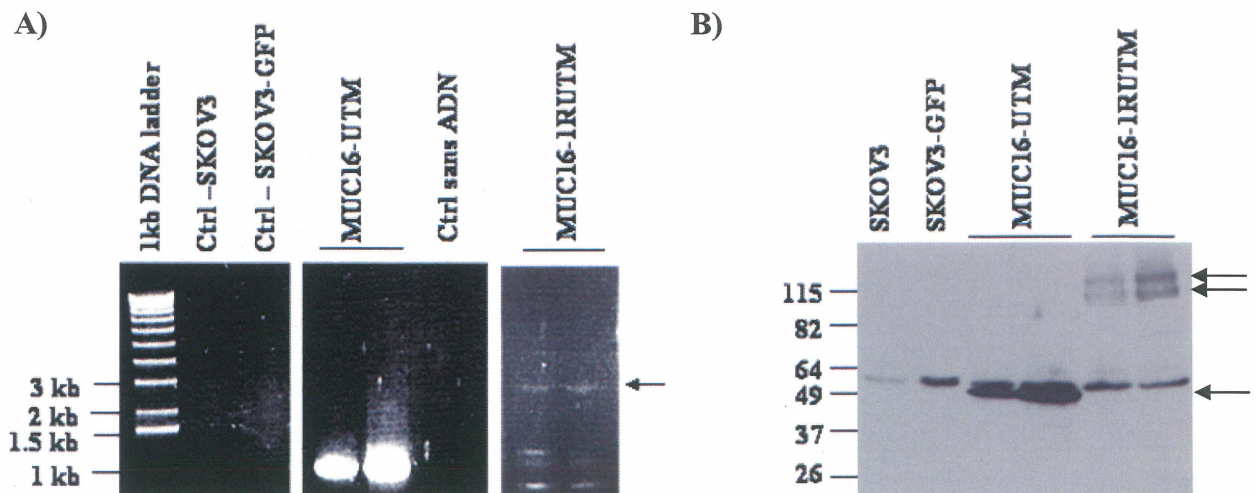
Les lysats cellulaires ont aussi été validés pour l'expression des protéines recombinantes. La figure 20 B) montre que les poids moléculaires des protéines MUC16-UTM et MUC16-1RUTM sont d'environ 49 kDa et 115 kDa comparés aux poids moléculaires attendus de 34,1 et 100,4 kDa, respectivement. Encore une fois ces différences dans les poids moléculaires s'expliqueraient par l'acquisition de glycosylations par les domaines unique et des répétitions.

Cette dernière validation montre également la fonctionnalité de l'étiquette c-myc car l'immunobuvardage avec l'anticorps anti-c-myc a bien fonctionné. L'étiquette poly-His fonctionne également car la purification par colonne de nickel suivie de l'immunobuvardage avec l'anticorps anti-c-myc montre les mêmes bandes que dans les lysats (données non montrées).

En résumé, la figure 20 montre bien l'expression des protéines recombinantes membranaires par les populations stables et démontre que les étiquettes utilisées sont fonctionnelles.

Figure 20 : Validation de l'expression des protéines recombinantes membranaires (domaines extracellulaires de CA125).

Une réaction de RT-PCR a été effectuée avec l'ARN extrait des populations stables SKOV-3 et les différents domaines de CA125 ont été amplifiés. Les produits de PCR ont été migrés sur gel d'agarose 0.8% (A). Les lysats des populations stables ont été migrés sur gel SDS-PAGE 10%. Les gels ont été analysés par immunobuvardage de type western avec l'anticorps anti-c-myc (B).

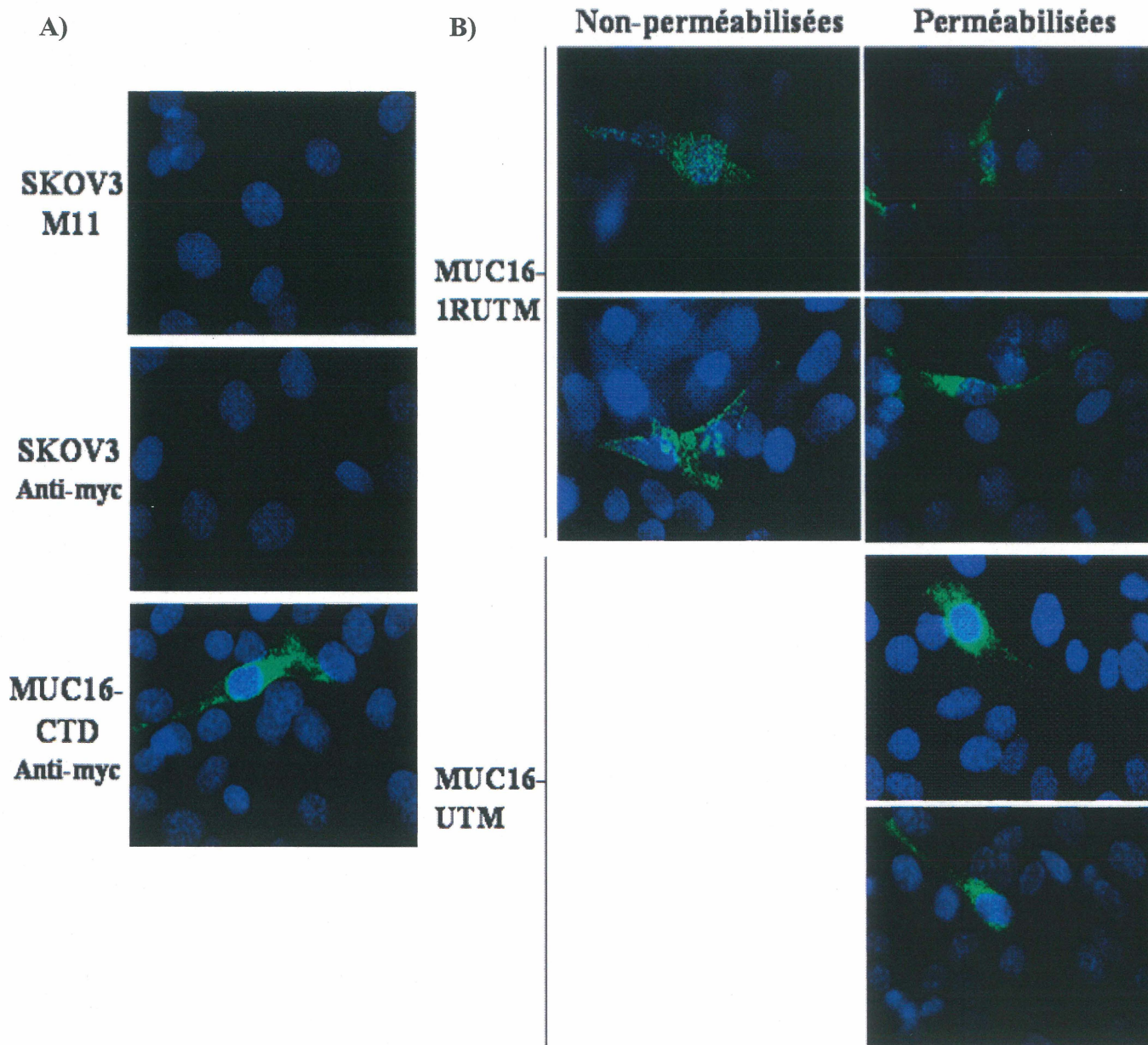


45. Localisation cellulaire des protéines recombinantes MUC16-UTM et MUC16-1RUTM

La localisation des protéines MUC16-UTM et MUC16-1RUTM chez les populations stables a été vérifiée par immunofluorescence indirecte sur lame. À la figure 21, le signal vert détecté indique la localisation de la protéine de fusion via l'étiquette c-myc ou encore la répétition de CA125 et le signal bleu désigne l'emplacement des noyaux par coloration de l'ADN avec le DAPI. Premièrement, on constate que les contrôles négatifs SKOV3 révélés avec anti-c-myc et M11 sont bien négatifs pour l'expression de l'étiquette c-myc et de répétitions de CA125 (Figure 21 A). Les cellules parentales n'expriment donc aucune protéine de fusion avec étiquette c-myc et n'expriment ni de CA125. Le contrôle positif MUC16-CTD qui exprime en C-terminal de la protéine l'étiquette c-myc démontre un signal à la membrane cellulaire et aussi dans la voie de sécrétion. En (B), dans le cas des populations stables MUC16-UTM, révélées avec l'anticorps anti-c-myc, on peut voir que la protéine est localisée principalement à la membrane cellulaire (voir flèches sur les images) mais aussi en points, patron souvent observés chez des cellules non-perméabilisées exprimant des protéines membranaires (MOSER et al., 2001). Lorsque les cellules sont perméabilisées, on peut aussi voir, en plus du signal à la membrane plasmique, un patron d'expression dans la voie de sécrétion, ce qui est attendu puisque la protéine doit d'abord passer dans cette voie avant d'être ancrée à la membrane par son domaine transmembranaire comme les protéine transmembranaire intégrale de type I. On observe la même chose pour les populations stables MUC16-1RUTM, elles révélées avec l'anticorps M11. La localisation des protéines recombinantes produites par les populations stables est bien celle espérée, c'est-à-dire membranaire.

Figure 21 : Localisation cellulaire des protéines de fusion MUC16-UTM et -1RUTM.

Les cellules ont étéensemencées dans des labteck et, à une confluence d'environ 80%, elles ont été fixées au paraformaldéhyde 3.7%. Les cellules ont ensuite été perméabilisées ou non et marquées à l'aide du DAPI et d'un anticorps contre les répétitions de CA125 (M11) ou un anticorps contre l'étiquette c-myc. En (A), les contrôles négatifs perméabilisés (SKOV3) avec les anticorps M11 et anti-c-myc et positif (MUC16-CTD). En (B), détection des deux protéines de fusions chez les populations stables. En vert : MUC16-CTD, MUC16-UTM ou MUC16-1RUTM, en bleu : ADN du noyau coloré au DAPI. Objectif 100X sur microscope Olympus 1X70.

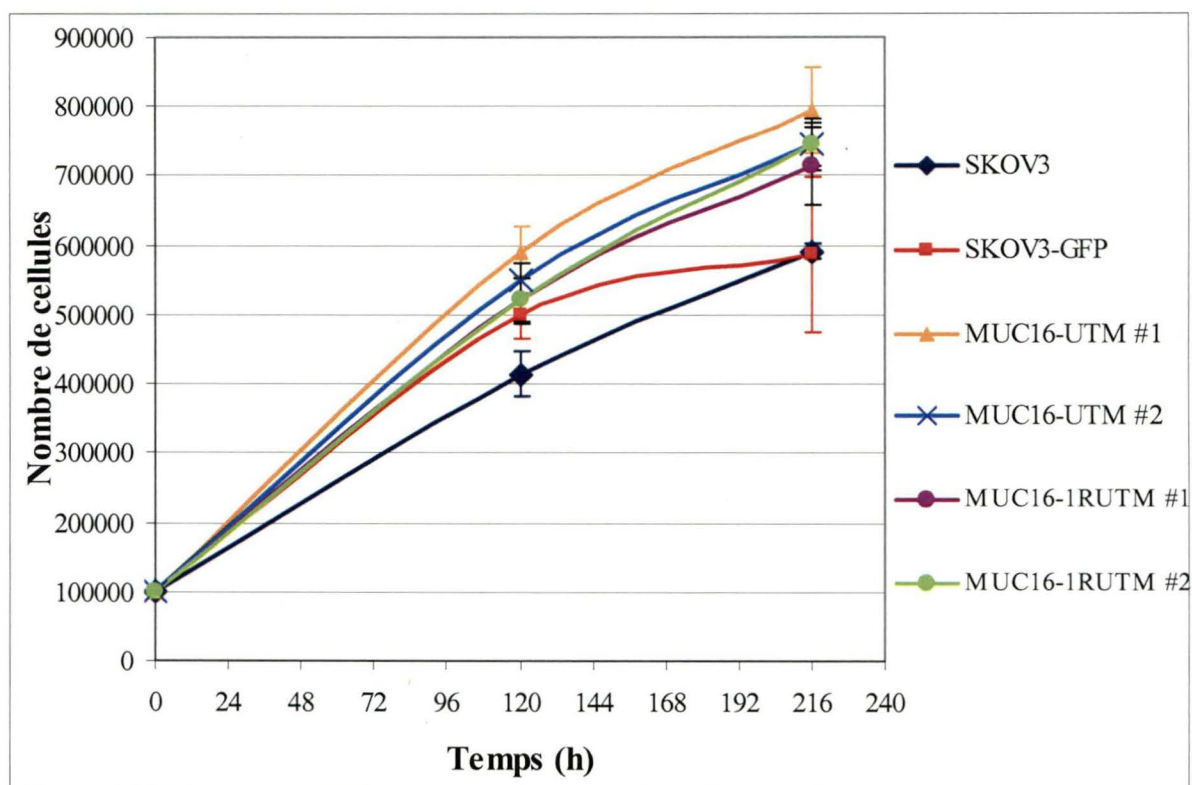


46. Comparaison des profils de croissance des populations stables

Afin de déterminer si le gain de fonction, c'est-à-dire l'acquisition de l'expression des domaines MUC16-UTM et MUC16-1RUTM, confère un avantage de prolifération pour ces cellules comparé aux cellules contrôles, un essai de prolifération a été réalisé avec les populations stables. Un même nombre de cellules des différentes lignées ont étéensemencées dans plusieurs puits et ont été incubées. À chaque jour, les cellules ont été dénombrées au bleu de trypan pour ensuite pouvoir tracer les courbes de croissance. Ces courbes, présentées à la figure 22, montrent que jusqu'à 120h, les différentes lignées croissent d'une manière similaire. Autrement dit, la phase exponentielle des courbes est semblable pour toutes les lignées, donc une même vitesse de croissance. Au-delà de ce point des courbes, les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM continuent de croître tandis que les lignées contrôles SKOV3 et SKOV3-GFP ont atteint leur phase plateau. Ces résultats suggèrent que la sensibilité des différentes lignées cellulaires à l'inhibition de contact est différente, soit plus faible pour les cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM que pour les cellules contrôles.

Figure 22 : Courbe de croissance cellulaire des populations stables dérivées de la lignée SKOV3.

Pour chaque lignée cellulaire, 100 000 cellules ont étéensemencées dans plusieurs puits. À chaque jour, les cellules ont été récoltées, colorées au bleu de trypan et dénombrées. Chaque point représente une moyenne des résultats obtenus pour 3 puits, chacun compté en triplicatas. Seul les points importants de la courbe ont été portés en graphique pour but de clarté.



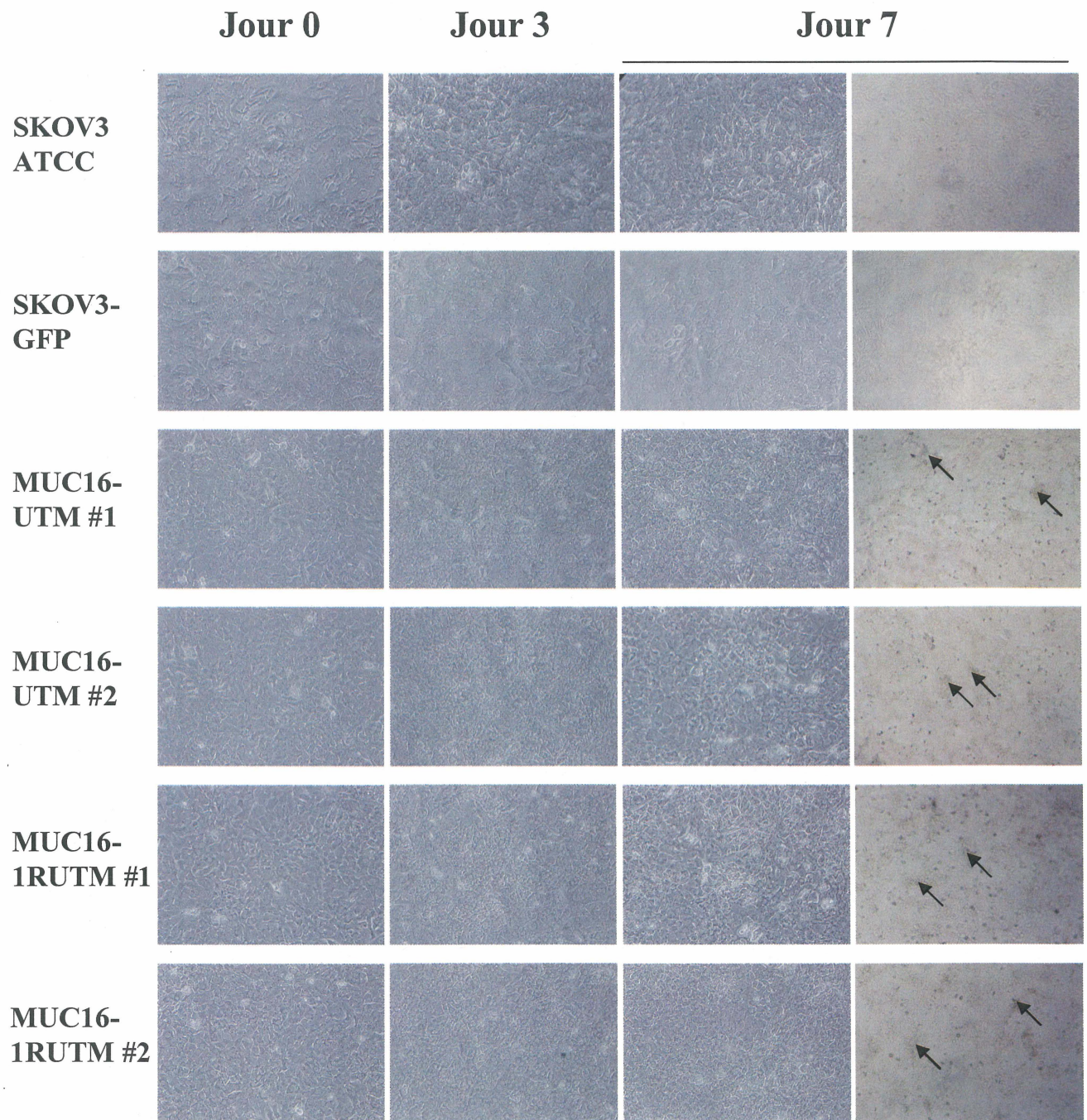
47. Formation de foyers post confluence

L'une des caractéristiques des cellules cancéreuses est leur capacité à croître de manière illimitée et à ne plus faire d'inhibition de contact mise en évidence par la phase plateau dans une courbe de croissance. Les cellules parentales utilisées, les cellules SKOV3, possèdent cette caractéristique. Nous avons voulu déterminer l'effet du gain de fonction (MUC16-UTM

et MUC16-1RUTM) sur la formation de foyers en état de post-confluence. Techniquement, les cellules ont été considérées comme au jour 0 lorsqu'elles ont atteint une confluence de 100%. Des photos de chaque lignée cellulaire ont été prises aux jours 0, 3 et 7. La figure 23 montre qu'au jour 0, toutes les lignées cellulaires ont une confluence de 100%, donc similaire. Au jour 3, on n'observe pas vraiment de différences marquées entre les différentes lignées et on peut voir que les cellules semblent s'entasser de plus en plus dans les puits. Au jour 7, cependant, la présence de foyers de cellules empilées pour les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM est évidente. Ces foyers sont effectivement plus apparents lorsqu'observés à l'objectif 4X, où on remarque des taches brunâtres dans les puits, représentant des amas de cellules, phénomène qui n'est pas encore observé au jour 7 chez les cellules contrôles SKOV3 et SKOV3-GFP. C'est donc dire que le gain de fonction des populations stables, autant par MUC16-UTM que par MUC16-1RUTM permet une formation de foyers post-confluence plus rapide. Ces cellules, par cette caractéristique, seraient alors considérées comme plus tumorigéniques.

Figure 23 : Formation de foyers post-confluence.

Chaque lignée cellulaire ont étéensemencées à raison de 350 000 cellules par puits de plaques 6-puits et incubées en changeant le milieu de culture tous les 3 jours. On a considéré le jour 0 comme celui où une confluence de 100% a été atteinte. Des photos ont été prises au microscope aux jours 0, 3 et 7 et des foyers de cellules peuvent être observés. Objectifs 10X (3 premières colonnes) et 4X (dernière colonne) du microscope inversé Nikon Eclipse TS100.



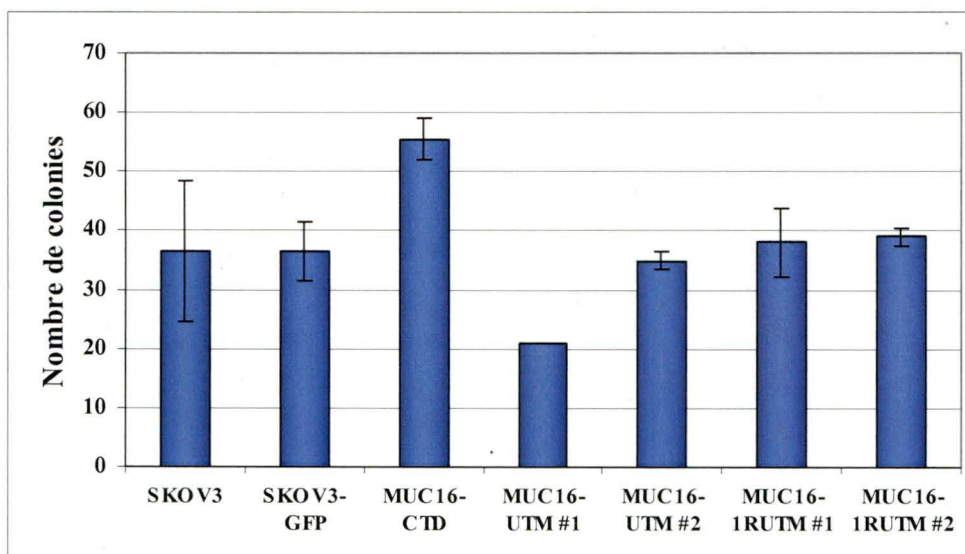
48. Essai de clonogénicité sur plastique

Un indice de tumorigénicité des cellules est leur capacité à former des foyers cellulaires lorsqu'elles sont en situation de faible densité. Des cellules possédant un plus grand potentiel tumorigénique formeront plus de foyers et/ou ces foyers compteront plus de cellules. C'est ce que l'essai de clonogénicité en conditions adhérentes permet de mesurer. Les populations stables exprimant des protéines recombinantes à la membrane cellulaire (MUC16-UTM et MUC16-1RUTM) peuvent être comparées aux cellules contrôles SKOV3 et SKOV3-GFP ainsi qu'aux cellules MUC16-CTD, connues pour être très tumorigéniques. La figure 24 permet cette comparaison autant au niveau du nombre de colonies formé (A) qu'au niveau de la grosseur de ces colonies (nombre moyen de cellules / colonie) (B). Dans le cas du nombre de colonies (figure 24 A), on détecte une différence significative ($p < 0,05$) entre les cellules contrôles SKOV3 et SKOV3-GFP et les cellules MUC16-CTD, c'est-à-dire que ces dernières forment plus de colonies que les contrôles. Cependant, les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM n'affichent pas de différence significative entre leur nombre de colonies formées et celui des cellules contrôles. Pour ce qui est du nombre de cellules par colonie (figure 24 B), il n'existe pas de différence significative entre toutes les populations confondues. On observe de très grandes barres d'erreurs reflétant que la grosseur des colonies était très différente pour une même lignée cellulaire. On peut cependant remarquer que les cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM, aussi bien que les MUC16-CTD démontrent une tendance vers un nombre de cellules par colonie plus élevé, ce qui suggère que ces cellules auraient un potentiel tumorigénique plus grand que les contrôles.

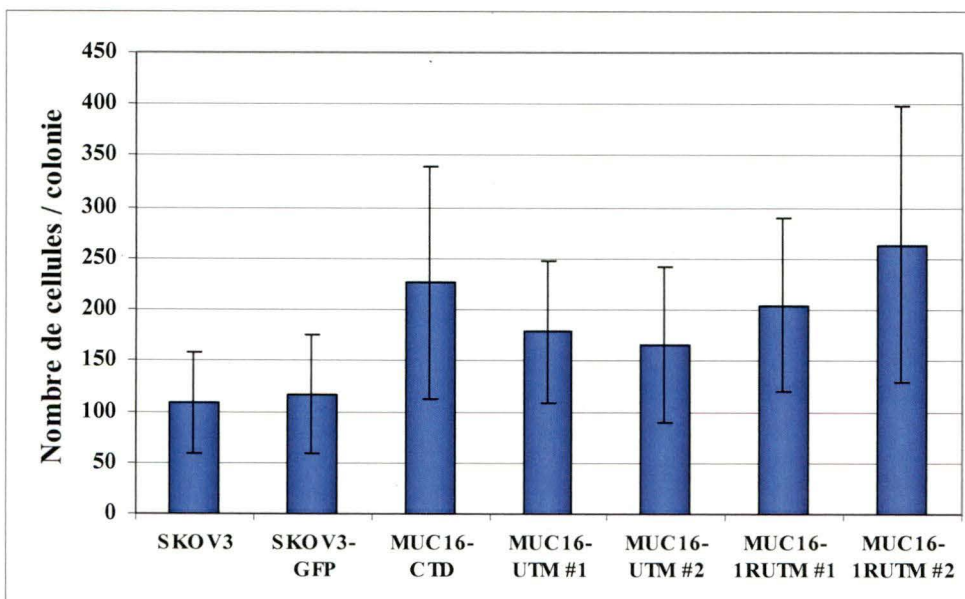
Figure 24 : Nombre de colonies et nombre de cellules par colonies formées par essai de clonogénicité sur plastique.

Chaque lignée cellulaire ont étéensemencées dans des plaques 6-puits (100 cellules / puits) et des foyers de cellules ont été formés à partir de cellules uniques. Le nombre de colonies formées (A) et le nombre de cellules par colonie (de 10 colonies par puits déterminées aléatoirement) (B) ont été comptés après une incubation de 10 jours ($p < 0,05$).

A)



B)



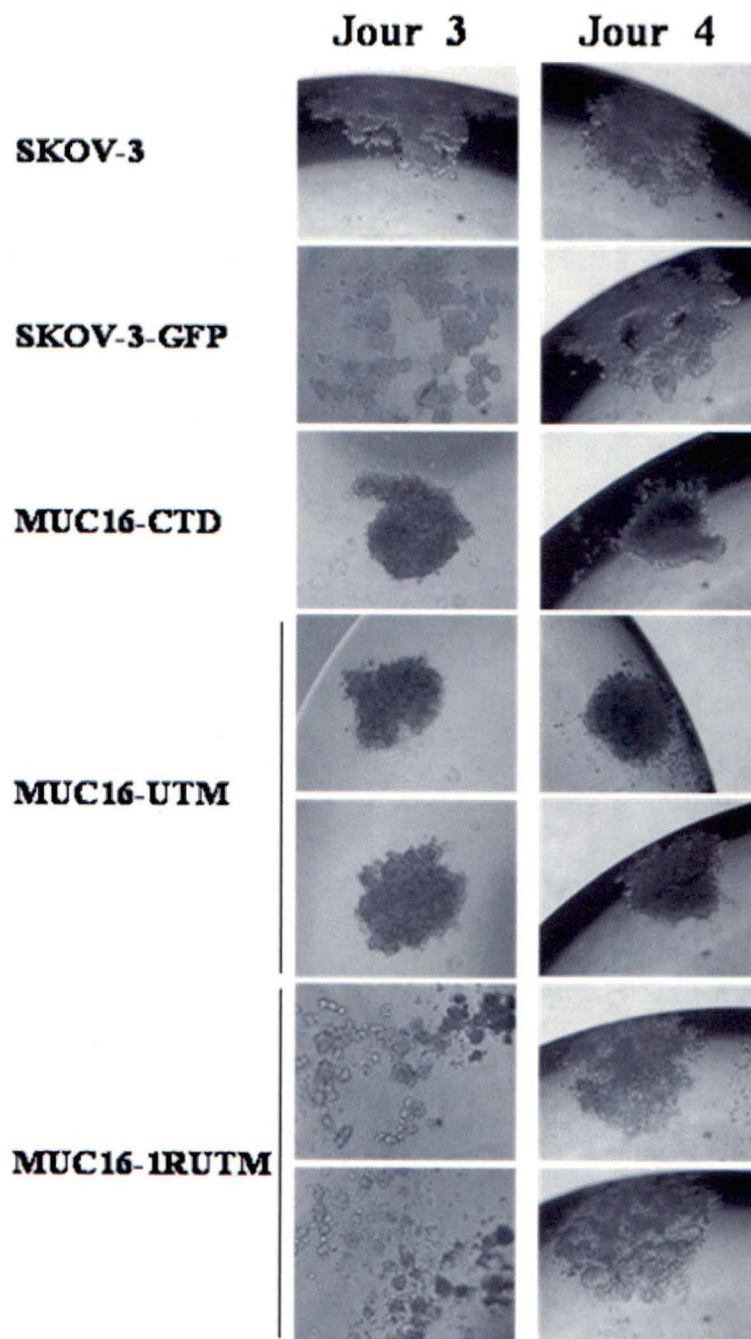
49. Interaction cellule-cellule et croissance en absence d'ancrage

Deux méthodes sont utilisées pour montrer la capacité des cellules à former des agrégats cellulaires (interactions cellules-cellules homotypiques) et reflétant le potentiel tumorigénique : la formation de sphéroïdes et la formation de colonies en milieu semi-solide (agar mou)

La figure 25 A) montre la formation des sphéroïdes dans la goutte inversée après 3 et 4 jours d'incubation. Au jour 3, les lignées contrôles SKOV3 et SKOV3-GFP semblent former des agrégats très lâches en comparaison avec le contrôle positif de formation de sphéroïdes MUC16-CTD, qui forme un sphéroïde d'apparence très serré. Les populations stables MUC16-UTM forment aussi des sphéroïdes dès le jour 3 et ceux-ci s'apparentent à la lignée MUC16-CTD. Dans le cas des cellules MUC16-1RUTM, elles sont plutôt distancées et ressemblent davantage aux cellules contrôles. Au jour 4, des sphéroïdes se sont formés chez les lignées contrôles et chez les MUC16-1RUTM d'une manière similaire, c'est-à-dire des agrégats plus lâches que chez les lignées MUC16-CTD et MUC16-UTM. En résumé, les cellules exprimant MUC16-UTM forment des sphéroïdes très serrés comme les cellules exprimant MUC16-CTD tandis que les cellules exprimant MUC16-1RUTM agissent plus comme les cellules contrôles en formant des sphéroïdes plus tard et ceux-ci sont plus lâches. Cela suggère donc que les cellules MUC16-UTM sont tumorigéniques au même point que les cellules MUC16-CTD, plus que les cellules contrôles et les cellules MUC16-1RUTM.

Figure 25 : Formation de sphéroïdes et de colonies en agar mou par agrégation cellulaire.

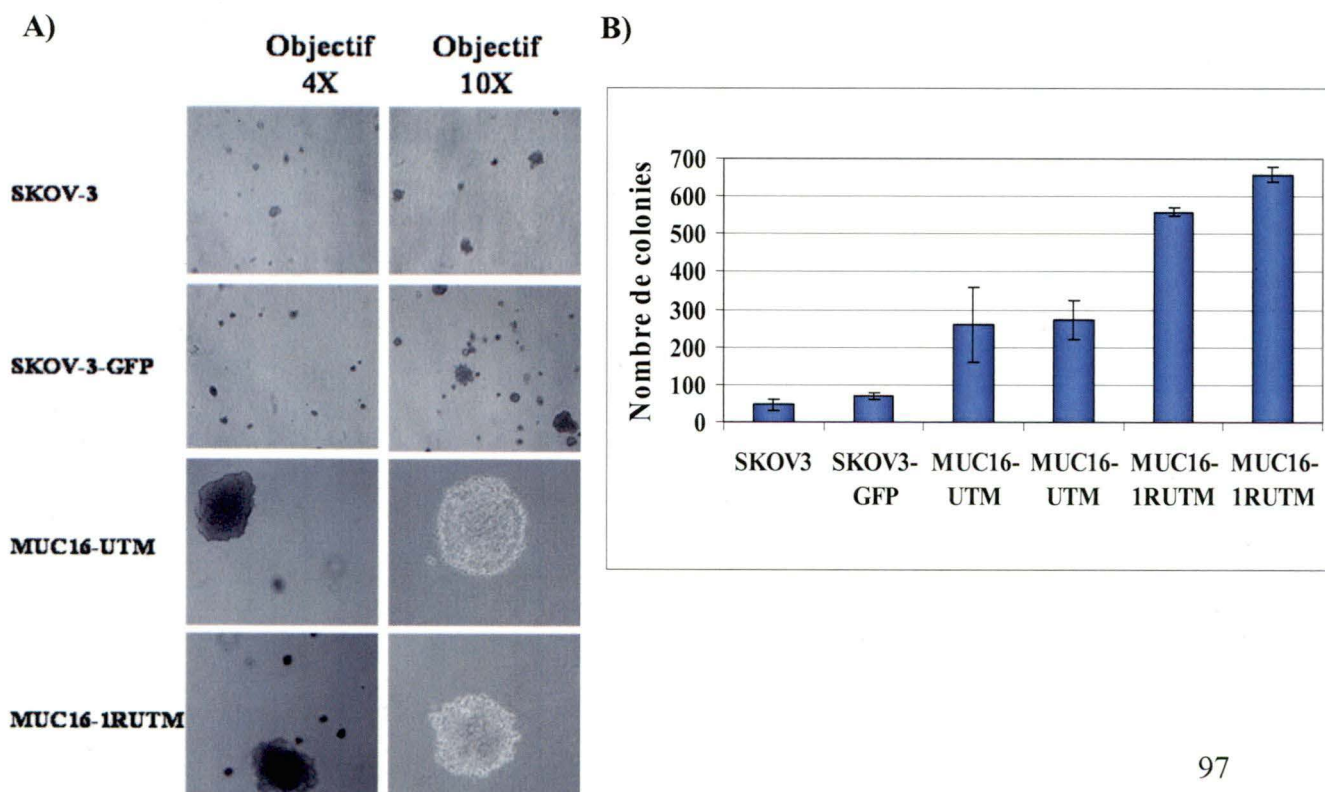
Dans des pétris de 10 cm, des gouttes de 15 μ L contenant 4 000 cellules ont été placées suspendues au couvercle d'un pétri contenant du PBS et incubés jusqu'à 4 jours. Les photos des sphéroïdes formés ont été prises aux jours 3 et 4. Objectifs 10X du microscope inversé Nikon Eclipse TS100.



La figure 26 nous permet de comparer les colonies ayant poussé dans le milieu semi-solide. En (A), les photos prises montrent que les colonies formées par les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM sont beaucoup plus grosses que celles formées par les cellules contrôles SKOV3 et SKOV3-GFP. De plus, l'histogramme du nombre de colonies pour chaque lignée semble révéler que, de façon significative, les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM forment plus de colonies que les cellules contrôles, soit respectivement 5 et 10 fois plus. Le phénotype des cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM suggère un caractère plus tumorigénique que celui des cellules contrôles.

Figure 26 : Essai de croissance en absence d'ancrage.

Dans des plaques 6-puits, 5 000 cellules ont été resuspendues dans un mélange agar-milieu et placées sur une première couche d'agar. Les cellules ont été incubées ainsi durant 30 jours et des photos des colonies formées ont ensuite été prises (A) et ont été dénombrées ($p < 0,05$) et portées en histogramme (B). Objectifs 4X et 10X du microscope inversé Nikon Eclipse TS100.



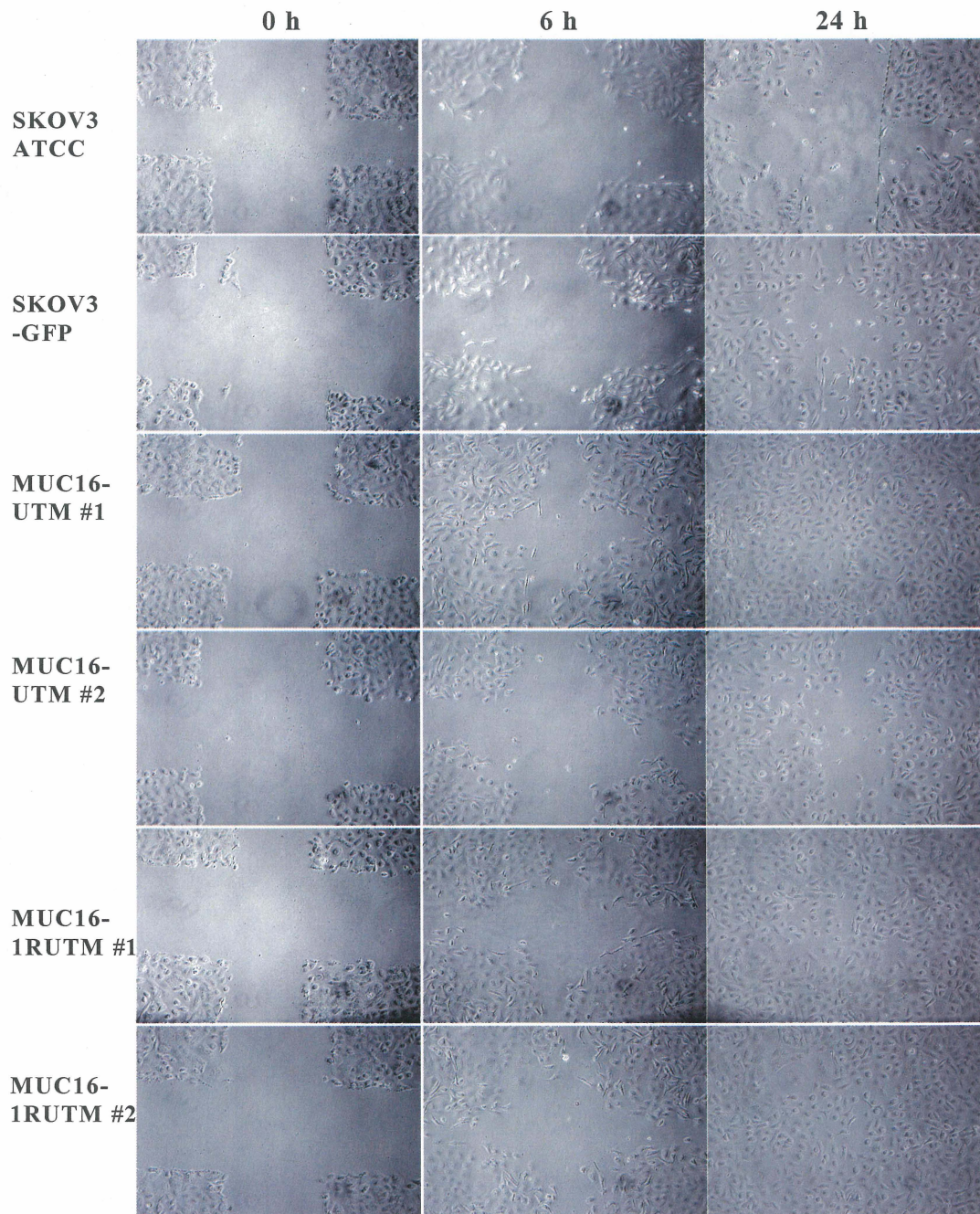
50. Migration cellulaire

Les cellules SKOV3 (lignée parentale) sont considérées comme étant des cellules ayant un certain potentiel migratoire. Le gain de fonction (MUC16-UTM et -1RUTM) pourrait avoir une influence sur ce phénomène impliquant possiblement le domaine extracellulaire de CA125. Les SKOV3-CTD avaient montrés une augmentation de la migration cellulaire par rapport à la lignée parentale et nous voulions par cette expérience vérifier l'influence de la partie extracellulaire de CA125 dans le processus migratoire. L'essai de migration par blessure de la monocouche constitue un essai dont le résultat est qualitatif mais donne tout de même une idée du potentiel migratoire des cellules. Les cellules ont donc étéensemencées de manière à obtenir une monocouche de cellules semblable pour toutes les lignées. Cette monocouche de cellules a subi une blessure cruciforme et a ensuite été lavée pour retirer toutes cellules ayant pu être décollées du puits. Les cellules ont été incubées 24 heures dans du milieu contenant un agent anti-prolifératif, l'hydroxyurée, dont la concentration optimale pour les cellules SKOV3 a été déterminée préalablement. Des photos de la blessure montrant la migration des cellules ont été prises aux temps 0, 6 h et 24 h. La figure 27 montre d'abord qu'au temps 0, toutes les blessures des monocouches des différentes lignées sont comparables. Après 6 heures d'incubation, on peut voir que les cellules contrôles (SKOV3 et SKOV3-GFP) se sont déplacées un peu, se sont séparées des cellules des quatres quadrants. Dans le cas des populations stables MUC16-UTM et MUC16-UTM1R, la migration est déjà plus importante que chez les contrôles. Après 24 heures d'incubation, les cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM ont presque complètement rempli la blessure en migrant comparativement aux cellules contrôles chez lesquelles la blessure cruciforme est toujours visible.

Le potentiel migratoire des cellules SKOV3 semble donc augmenté lorsqu'on exprime de façon exogène à la surface cellulaire les domaines unique et unique + 1 répétition. Ces domaines extracellulaires de CA125 influencent donc le potentiel migratoire de la lignée cellulaire SKOV3.

Figure 27 : Migration cellulaire par blessure de la monocouche de cellules.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6-puits et une confluence de 100% a été atteinte. Une croix a été tracée dans le fond du puits à l'aide d'un embout de micropipette de 200 μ L. Les puits ont été lavés puis du milieu complet additionné de 75 mM d'hydroxyurée permettant de bloquer la prolifération des cellules ont été ajoutés aux puits. Les plaques ont été ensuite incubées à 37°C et 5% CO₂. Des photos des puits ont été prises après 6 et 24 heures pour observer la migration des cellules dans l'espace créé par la blessure. Objectifs 10X du microscope inversé Nikon Eclipse TS100.



DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le cancer épithélial de l'ovaire est connu comme étant le cancer gynécologique le plus létal. En effet, malgré le fait qu'il s'agisse d'une maladie relativement rare (on estime qu'une femme sur 55 sera atteinte au cours de sa vie), le cancer épithélial de l'ovaire est souvent sans merci pour les femmes qui en sont atteintes. Ce phénomène s'explique par l'absence de symptômes caractéristiques de la maladie durant les phases précoces et l'absence de test de détection précoce assez sensible et spécifique. La survie à 5 ans d'une patiente s'élève à 70-90% lorsque le cancer est détecté au stade I; ce pourcentage chute drastiquement à 20% lorsqu'il est détecté durant les stades tardifs (SCHUMMER et al., 1999; WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003). Après 10 ans, les chances de survie de la patiente sont pratiquement nulles.

Jusqu'à maintenant, le marqueur le plus utilisé est CA125, une mucine exprimée à la surface des cellules épithéliales de l'ovaire cancéreux et absente de la surface de l'ovaire normal. Ce marqueur ne peut être utilisé pour la détection précoce car on le retrouve exprimé dans des situations normales ou bénignes dans différents organes et liquides biologiques. Il s'agit donc plutôt d'un marqueur pour le suivi des patientes. Il n'existe encore à ce jour, c'est-à-dire plus de 25 ans après sa découverte, que peu d'informations concernant les caractéristiques moléculaires et les fonctions associées à CA125. On connaît quelques partenaires d'interactions de CA125 tels que la galectine-1 (HUGUES, 1997) et la mésohéline (RUMP et al., 2004; GUBBLES et al., 2006), interactions laissant supposer des rôles dans l'adhésion aux molécules à la matrice extracellulaire et dans les interactions cellulaires homo- et hétérotypiques. De plus, d'autres mucines membranaires sont également étudiées et peuvent

donner des pistes d'études de CA125. Par exemple, il a été démontré que MUC1 et MUC4, augmentaient l'agressivité des tumeurs dans des modèles *in vivo* (KOHLGRAF et al., 2003; SINGH et al., 2004). Notre laboratoire a développé des modèles d'études de CA125 pour déterminer les effets d'une perte d'expression de CA125 (clones stables CA125-knockdown) et pour identifier les rôles du domaine C-terminal de CA125 par un gain de fonction (populations stables MUC16-CTD). Nous nous sommes intéressés par ce projet aux rôles que pouvaient avoir le domaine extracellulaire de CA125 dans la tumorigénicité et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses de l'ovaire. Le modèle de perte de fonction existant dans le laboratoire a été utilisé pour approfondir les connaissances sur les interactions que font les cellules tumorales dans leur microenvironnement (cavité intrapéritonéale), c'est-à-dire des interactions cellulaires homotypiques comme les agrégations cellulaires dans l'ascite et hétérotypiques tel qu'avec les cellules mésothéliales et cellules immunitaires. Des populations stables exprimant différents domaines extracellulaires de CA125 ont été construits afin de déterminer leur influence sur la tumorigénicité et les capacités métastatiques des cellules cancéreuses de l'ovaire.

51. Interaction des cellules CA125-positives ou de CA125 du milieu conditionné ou présent dans l'ascite avec son microenvironnement

51.1 CA125 interagit avec la surface des lymphocytes

Le microenvironnement des cellules métastatiques cancéreuses de l'ovaire comprend, en plus de la paroi de cellules mésothéliales, tout le contenu de la cavité intrapéritonéale. Les cellules

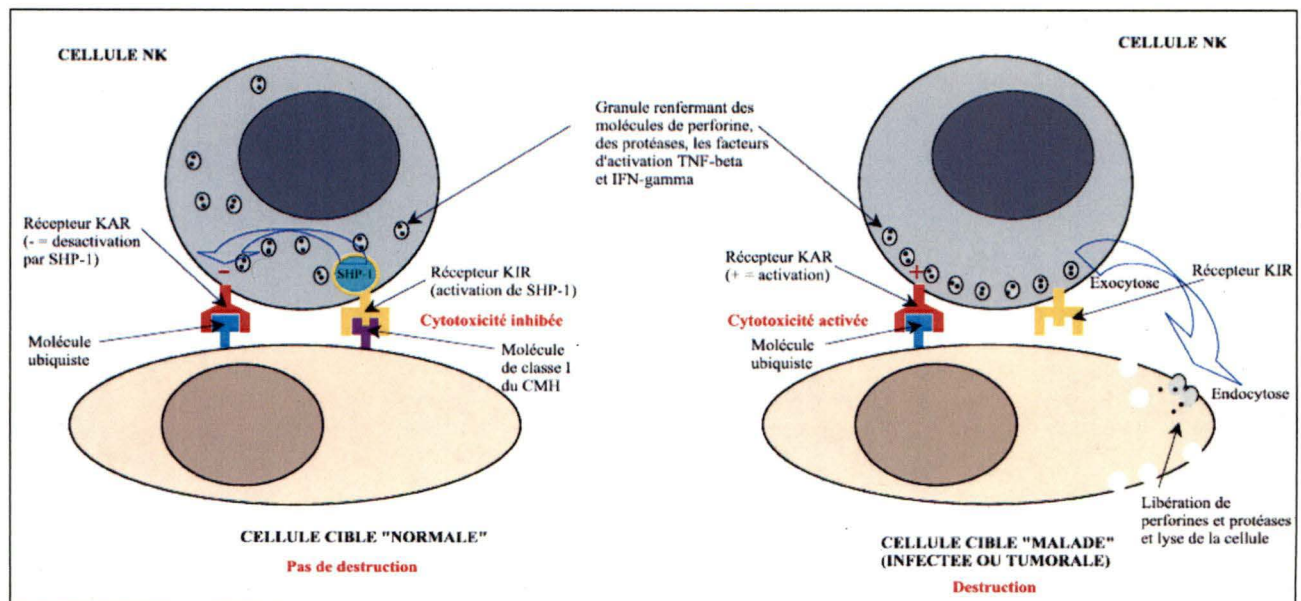
métastatiques baignent dans l'ascite, un liquide suintant des vaisseaux sanguins riche en nutriments et facteurs de survie et contenant une quantité considérable de cellules du système immunitaire. Dans ce microenvironnement, le système immunitaire est impliqué dans la surveillance anti-tumorale; les cellules cancéreuses doivent donc développer des mécanismes afin d'y échapper. En effet, les cellules natural killers (NK), entre autres, sont spécialisées pour lyser les cellules transformées dont les cellules cancéreuses. Nous avons d'abord voulu déterminer si la présence de CA125 dans l'ascite avait un effet sur ces lymphocytes. Des lymphocytes isolés du sang périphérique et de l'ascite de patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire (donc ayant été incubés en présence de CA125 dans les deux cas) et des lymphocytes de donneurs en santé incubés 72 h dans l'ascite de patiente ont été testés par cytométrie de flux pour la présence à leur surface de CA125 (figure 11). Dans les deux conditions, le test s'est avéré positif, c'est-à-dire que les cellules NK présentaient du CA125 à leur surface. Quoique positifs pour la présence de CA125, les patrons de fluorescence observés par cytométrie de flux pour les lymphocytes de patientes provenant de leur sang et de l'ascite étaient différents (pics à différents endroits). Ces pics représentent des populations de lymphocytes possédant des caractéristiques différentes (expression de différentes molécules de surface telles que CD16 et CD56) (résultats obtenus par le laboratoire du Dr Patankar, BELISLE et al., 2007, à l'annexe II). Deux hypothèses expliquant la présence de CA125 à la surface des lymphocytes ayant été en présence de la mucine s'offraient alors : 1) les lymphocytes se sont mis à exprimer CA125 suite à l'exposition à l'ascite qui contient CA125 aussi d'autres molécules avec action biologiques potentielles ou 2) CA125 de l'ascites ou du milieu conditionné lie la surface des lymphocytes. Pour vérifier la première hypothèse, une réaction de RT-PCR a été faite avec les différents lymphocytes utilisés et ayant subi les mêmes traitements que pour l'expérience de cytométrie de flux (figure 12).

Cette expérience a permis de réfuter la première hypothèse car les RT-PCR n'ont montré aucune expression de CA125 par les lymphocytes. Ceci indique donc que CA125 détecté à la surface des lymphocytes était donc lié à la surface de ceux-ci. La caractérisation de l'effet de la liaison de CA125 sur les lymphocytes a été réalisée par la suite par l'équipe du Dr Patankar et est toujours en cours.

Notre intérêt s'est davantage porté vers la molécule de CA125 associée à la surface des cellules cancéreuses de l'ovaire (CA125 membranaire). En effet, sachant que CA125 présent dans l'ascite et le milieu conditionné de cellules OVCAR-3 pouvait lier la surface des lymphocytes, l'hypothèse concernant l'évasion du système immunitaire des cellules cancéreuses était que CA125 aurait un effet quelconque sur l'efficacité de la lyse des cellules cancéreuses par les cellules NK. Il est connu que les cellules cancéreuses exprimant des mucines ou situées dans un environnement où les mucines sont très présentes sont protégées du système immunitaire par séquestration des cytokines, par inactivation des effecteurs immunitaires ou encore lorsque les mucines forment une barrière physique de protection (HOLLINGSWORTH et al., 2004). Nous avons donc tenté des essais préliminaires de cytotoxicité des cellules NK. Les clones stables CA125-knockdown et leurs contrôles ont été placés en co-culture avec une lignée de cellules NK, les cellules NKL afin d'observer la lyse des cellules tumorales. On sait que les cellules OVCAR-3 sont relativement sensibles à la lyse par les cellules NK et nous voulions déterminer si la présence de CA125 à la surface des cellules avait un effet sur cette lyse. Nous avons effectivement pu remarquer une différence significative dans le nombre de cellules et de colonies de cellules résistantes à la lyse par les cellules NK. Les lignées parentale et ScFv contrôle (exprimant CA125) sont moins sensibles à la lyse que les cellules 1 :9#9 et 1 :9#7 (CA125-knockdown) d'un facteur 10 environ selon

les histogrammes du nombre de colonies et de cellules toujours vivantes après la co-culture de 72 h (figure 13). Ces résultats démontrent que CA125 aurait un effet protecteur pour les cellules cancéreuses contre les cellules NK. Cette conclusion concorde avec certains résultats obtenus dans le laboratoire. En effet, des résultats de notre laboratoire montrent que les cellules CA125-knockdown sont plus sensibles à l'apoptose induite par les cytokines cytotoxiques TRAIL et FasL (cytokines libérées entre autres par les cellules NK) que les cellules exprimant CA125 (lignée parentale OVCAR-3 et scFv contrôle) (données non publiées). Ceci suggère donc que les cellules cancéreuses pourraient utiliser ce moyen pour échapper au système immunitaire. On pourrait aussi suggérer que CA125 présents dans le milieu de culture et/ou CA125 membranaire lie un récepteur à la surface des cellules NK et inhiberait la lyse par les cellules NK (voir figure 28).

Figure 28 : Mécanismes de cytotoxicité des cellules NK envers les cellules normales vs les cellules transformées (adapté de www.inpr.fr).



51.2 Les cellules cancéreuses de l'ovaire exprimant CA125 se lient aux cellules mésothéliales via la mésothéline

À un certain stade du cancer de l'ovaire, des cellules tumorales se détachent de la tumeur et se déplacent dans la cavité intrapéritonéale avec les mouvements causés par le diaphragme lors de la respiration. Les cellules ou sphéroïdes cancéreux se localisent finalement dans la cavité péritonéale en s'accrochant à la paroi de cellules mésothéliales. Une interaction entre des cellules cancéreuses de l'ovaire exprimant CA125 et des cellules de souris exprimant la mésothéline a déjà été démontrée (RUMP et al., 2004). On sait également que les cellules tumorales de l'ovaire et les cellules mésothéliales se lient via d'autres molécules de surface comme CD44H et l'acide hyaluronique (CANNISTRA et al., 1993; GARDNER et al., 1996) ainsi que les intégrines β_1 et la fibronectine (STROBEL et CANNISTRA, 1999; CASEY et SKUBITZ, 2000). Cependant, le groupe de Cannistra a montré qu'il restait une ou des interaction(s) résiduelle(s) entre les deux types de cellules lorsqu'on bloque ces interactions (CANNISTRA et al., 1993). L'étude de la liaison des répétitions de CA125 à la surface de cellules cancéreuses de l'ovaire à des cellules exprimant la mésothéline (RUMP et al., 2004) permettait donc de poser l'hypothèse que cette adhésion résiduelle entre cellules mésothéliales et cellules cancéreuses de l'ovaire était due à l'interaction CA125-mésothéline. Afin de vérifier cette interaction autant au niveau moléculaire que cellulaire, différentes expériences ont été réalisées. Nous avons montré que les molécules CA125 et méso-Fc (mésothéline recombinante) pouvaient se lier entre elles par une technique de « western blot overlay ». On observe même que CA125 purifié de deux sources différentes, soit le milieu de culture conditionné des cellules OVCAR-3 et l'ascite de patiente, sont aussi efficaces pour se lier à la méso-Fc et cette interaction est considérée comme forte dans les deux cas. Nous

avons ensuite voulu vérifier si la mésothéline pouvait lier CA125 à la surface cellulaire. Une expérience de cytométrie de flux utilisant les clones stables CA125-knockdown et leurs cellules contrôles, dérivées de la lignée OVCAR-3 et la méso-Fc a montré une forte liaison de la méso-Fc aux cellules contrôles CA125-positives à leur surface comparé aux cellules CA125-knockdown. On observe cependant une faible interaction de la méso-Fc à la surface des cellules CA125-knockdown comparativement aux contrôles. Cette interaction pourrait être due au fait que la méso-Fc peut lier faiblement d'autres molécules de surface des cellules cancéreuses de l'ovaire ou encore qu'il existe une expression minimale de CA125 à la surface des cellules 1 :9#9 et 1 :9#7, qui ont bien été démontrés comme étant des knockdown et non des knockout complets (les knockdown expriment de 20 à 25 fois moins de CA125 que les contrôles, voir figure 7). La différence de liaison méso-Fc - cellules cancéreuses reste toutefois très grande entre les cellules CA125-positives et knockdown et nous confirme l'importance de cette liaison. Logiquement, l'étape suivante du raisonnement était de vérifier l'interaction entre cellules mésothéliales exprimant la mésothéline et des cellules CA125-positives. Pour ce faire, des cellules mésothéliales normales n'exprimant pas CA125 (démontré par RT-PCR) et une lignée cellulaire exprimant CA125 (HTB-30) ont été utilisées pour un essai de formation de doublets cellules mésothéliales - cellules CA125-positives. Dans cette expérience, les cellules OVCAR-3 normalement utilisées à cause de leur forte expression de CA125 n'ont pu être utilisées car elles sont reconnues pour former des agrégats cellulaires et la formation de doublets avec les cellules mésothéliales aurait été difficile à observer par cytométrie de flux. En colorant les deux types cellulaires à l'aide de fluorochromes différents, en les laissant adhérer ensemble puis en analysant les deux fluorochromes par cytométrie de flux, on remarque que quatre populations distinctes de cellules sont présentes. D'abord, une certaine proportion des deux types cellulaires n'a pas été

marquée par les fluorochromes. Ensuite, on distingue les deux populations de cellules colorées. Une dernière population de cellules représente les cellules qui possèdent les deux colorations. Il s'agit en fait de doublets de cellules HTB-30 – cellules mésothéliales, montrant l'interaction hétérotypique cellules mésothéline-positives – cellules CA125-positives. Considérant tous les résultats, on peut affirmer que les cellules cancéreuses de l'ovaire lient les cellules mésothéliales via une interaction entre CA125 à la surface des cellules tumorales et la mésothéline à la surface des cellules mésothéliales. Cette interaction pourrait donc favoriser le développement de métastases dans la cavité intrapéritonéale.

52. Construction et validation des populations stables sécrétant les domaines extracellulaires de CA125

Connaissant certaines interactions et rôles possibles de la portion extracellulaire de CA125, il est intéressant de déterminer quels domaines particuliers de la protéine sont impliqués dans ces fonctions. Pour ce faire, des populations stables exprimant les domaines unique, 1 répétition et 2 répétitions ont été générés dans la lignée cellulaire OVCAR-3. Ces constructions possèdent un signal de sécrétion. Une population exprimant 1 répétition ne possède pas ce signal de sécrétion; la protéine recombinante est donc localisée au cytoplasme et constitue une population contrôle pour certaines expériences (figure 18). La méthode utilisée pour obtenir ces populations stables a été de produire des lentivirus pour ensuite les utiliser pour transduire les cellules humaines. Les avantages de l'utilisation de lentivirus pour produire des populations stables sont nombreux. Parmi eux, l'intégration de l'ADN des

lentivirus dans le génome de l'hôte ne nécessite pas la division cellulaire, ce qui favorise un fort pourcentage de cellules transduites et l'expression du transgène est longue et stable.

Une première validation de ces populations stables a été faite par RT-PCR et a montré que l'expression des domaines extracellulaires de CA125 était correcte dans les populations stables établies (figure 19 A). L'expression protéique a aussi été validée par immunobuvardage de type western ainsi que la bonne sécrétion des protéines recombinantes dans le milieu de culture conditionné par purification par colonne de nickel suivie d'un immunobuvardage de type western. Ces dernières étapes ont non seulement confirmé l'expression des protéines recombinantes, mais également la fonctionnalité des étiquettes utilisées (étiquette c-myc en C-terminal de la protéine par immunobuvardage et étiquette poly-His en N-terminal par colonne de nickel). La fabrication de ces domaines de CA125 sécrétés dans le milieu conditionné et purifiables devenait de plus en plus nécessaire pour la suite du projet puisque le but prochain de ces projets est de déterminer quels domaines spécifiques de CA125 confèrent les rôles immunologiques déterminés jusqu'à présent. De plus, si l'on observe la structure et les différents domaines de la mucine (voir figure 4), on peut voir qu'il existe plusieurs domaines SEA dans la portion extracellulaire de la protéine, plus précisément un dans le domaine unique et 5 dans le domaine des répétitions (dépendant du nombre de répétitions de la protéine). Ces domaines protéolytiques pourraient donner lieu à la présence de domaines de CA125 libres dans le milieu de culture après clivage, protéines que les protéines recombinantes produites pourraient bien représenter. Les populations stables sécrétant les différents domaines extracellulaires de CA125 ont donc été acheminées au laboratoire de notre collaborateur, Dr Manish Patankar (Madison, WI) pour des études plus approfondies des interactions CA125-mésothéline et CA125-lymphocytes. Le domaine N-

terminal de la protéine demeure encore inconnu de par sa séquence exacte et sa longueur mais méritera néanmoins dans le futur d'être étudié à son tour.

53. Construction et validation des populations stables exprimant les domaines extracellulaires de CA125 à la membrane

D'après les modèles d'étude de CA125 existant dans le laboratoire, certains phénotypes observés chez les cellules (clones stables CA125-knockdown et population stable MUC16-CTD) suggèrent des fonctions de CA125 dans la tumorigénicité et le potentiel métastatique. De nouveaux outils d'étude ont été mis au point afin de vérifier l'implication des domaines extracellulaires du marqueur de cancer ovarien CA125 dans la tumorigénicité et le potentiel métastatique. Cet outil consiste en des populations stables dérivées de la lignée parentale SKOV3 produites de la même manière que pour les populations de OVCAR-3 exprimant les protéines recombinantes sécrétées (lentivirus). La protéine produite par la population stable MUC16-UTM est formée du domaine transmembranaire et du domaine unique tandis que celle exprimée par la population MUC16-1RUTM est formée des deux mêmes domaines additionnés d'une répétition dégénérée et de la première répétition de CA125. Les deux protéines comptent également quelques acides aminés (3) chargés positivement afin d'assurer le bon ancrage de la protéine dans la membrane plasmique des cellules.

La validation de l'expression des domaines extracellulaires par les populations stables a été effectuée de la même manière qu'expliqué précédemment pour les populations stables OVCAR-3. D'abord, un RT-PCR a montré l'expression adéquate des gènes par les bandes attendues sur gel. Les immunobuvardages de type western sur des lysats des populations

stables utilisant l'anticorps anti-c-myc a également confirmé l'expression des protéines recherchées tout en validant la fonctionnalité de l'étiquette c-myc. La localisation des protéines recombinantes a également été validée par immunofluorescence. Cette expérience a permis de vérifier que les protéines MUC16-UTM et MUC16-1RUTM sont exprimées à la membrane plasmique. Lorsque les cellules ne sont pas perméabilisées, on observe la fluorescence à la membrane plasmique (contour de la cellule ou points sur la surface cellulaire, dépendant du focus au microscope). Lorsqu'on perméabilise les cellules, on observe toujours la membrane plasmique par la fluorescence, mais également la voie de sécrétion (RE et/ou Golgi). Les images obtenues sont satisfaisantes pour la validation de la localisation; toutefois, la microscopie électronique ou une colocalisation par immunofluorescence avec des protéines connues pour être exprimées à la membrane plasmique, au RE et au Golgi aurait été des expériences intéressantes à réaliser.

54. Profils de croissance et clonogénicité sur plastique similaires entre les populations stables MUC16-UTM et MUC-1RUTM et les cellules contrôles

La prolifération en situation normale et en état de post-confluence et la croissance des cellules à faible densité de départ, mesurées respectivement par des essais de courbes de croissance, de formation de foyers post-confluence et de clonogénicité sur plastique, sont des données représentatives de la tumorigénicité des cellules. Dans le cas des populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM, les courbes de croissance (figure 22) montrent des courbes semblables pour toutes les lignées dans la portion exponentielle de la courbe. Plus précisément, le temps de doublement pour chaque lignée a été calculé à l'aide de cette portion

de la courbe et sont très similaires entre eux (en moyenne, 51 ± 4 heures). C'est lorsque les courbes atteignent leur phase plateau qu'il est possible d'observer une différence entre les contrôles et les populations MUC16-UTM et -1RUTM. En effet, lorsque les cellules contrôles SKOV3 et SKOV3-GFP atteignent leur phase plateau, c'est-à-dire que les cellules prolifèrent beaucoup moins rapidement jusqu'à donner une pente très faible dans la courbe de croissance, les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM, elles, continuent de croître à une vitesse similaire à celle de la phase exponentielle de la courbe jusqu'à atteindre leur phase plateau plus tard. Ceci suggère donc que dans le gain de fonction, les domaines extracellulaires unique et unique + 1 répétition acquis par les populations stables confèrent aux cellules une diminution de la sensibilité à l'inhibition de contact, une caractéristique de la tumorigénicité.

Dans le même ordre d'idée, l'essai de formation de foyers en situation de post-confluence (un essai qualitatif) démontre des résultats similaires (figure 23) : lorsque la confluence des cellules contrôles est atteinte, les cellules prolifèrent beaucoup moins vite et ne s'empilent pas pour former des foyers. Dans le cas des populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM, par contre, au jour 3 post-confluence, on peut voir au microscope que les cellules s'entassent de plus en plus et distinguer la formation de foyers de cellules empilées au jour 7 post-confluence. Des résultats semblables ont également été observés précédemment dans le laboratoire avec les cellules MUC16-CTD. De façon consistante avec les courbes de croissance, les cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM sont moins sensibles à l'inhibition de contact et sont donc plus tumorigéniques que les cellules contrôles.

Un essai de clonogénicité sur plastique, essai mesurant la capacité des cellules à croître à faible densité de départ et par le fait même leur tumorigénicité a été réalisé sur les populations stables en comparaison avec les cellules contrôles SKOV3, SKOV3-GFP et la population stable MUC16-CTD. Tout d’abord, l’histogramme du nombre de colonies formées montre que la population MUC16-CTD réussit à former plus de colonies (de façon significative) que les cellules contrôles SKOV3 et SKOV3-GFP. En comparant aux contrôles les populations MUC16-UTM et MUC16-1RUTM, on ne distingue pas de différence significative entre ces dernières et les cellules SKOV3 et SKOV3-GFP.

Quant à la grosseur des colonies (i.e. nombre de cellules / colonie), l’histogramme ne démontre aucune différence significative entre toutes les populations stables. Les barres d’erreurs reflètent bien la grande hétérogénéité des colonies quant à leur grosseur. Sans elles, on pourrait suggérer une tendance de la grosseur des colonies à être plus importante chez les populations stables MUC16-CTD, -UTM et -1RUTM que chez les cellules SKOV3 et SKOV3-GFP. Tous ces facteurs considérés, on peut suggérer de cette expérience que si le domaine extracellulaire de CA125 est important dans la croissance à faible densité de cellules, il l’est moins que le CTD, donc que la queue cytoplasmique est essentielle pour obtenir un tel phénotype.

En résumé, les essais de courbe de croissance et de formation de foyers post-confluence montrent de façon convaincante que l’expression des domaines extracellulaires de CA125 à la surface des cellules SKOV3 augmente le potentiel tumorigénique de ces cellules. On pourrait même ajouter que le domaine unique est suffisant pour conférer cette caractéristique aux cellules puisqu’il n’y a pas vraiment de différence entre les phénotypes observés pour les

cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM. Quant à l'essai de clonogénicité sur plastique, une hypothèse expliquant le fait qu'il n'y a pas vraiment de différence détectée dans le nombre de colonies formées et le nombre de cellules par colonie entre les cellules MUC16-UTM et -1RUTM et les cellules contrôles serait que la population stable est constituée de plusieurs clones stables différents, exprimant à des niveaux différents les protéines recombinantes. Ainsi, le phénotype observé se trouve dilué par les cellules ayant une plus faible expression de la protéine recombinante à l'étude. De plus, les barres d'erreurs sont conséquemment très étendues et ne permettent pas d'affirmer de façon significative une différence.

55. Les cellules MUC16-UTM forment des agrégats cellulaires très serrés et croissent bien en absence d'ancrage

La capacité des cellules à former des agrégats cellulaires sans le recours d'ancrage reflète le potentiel tumorigénique des cellules cancéreuses. En effet, les cellules formant des agrégats et survivant ainsi sont considérées comme plus tumorigéniques car elles possèdent capacité à résister à l'anoïkose (forme d'apoptose induite par l'absence d'adhésion). Deux essais qualitatifs permettent de mesurer ces interactions en absence d'ancrage : la formation de sphéroïdes et la formation de colonies en milieu semi-solide.

En empêchant l'adhésion des cellules à la surface de plastique, il est possible de déterminer si les cellules ont la capacité de survivre en formant des agrégats cellulaires (appelés sphéroïdes). Les cellules contrôles SKOV3 et SKOV3-GFP ne forment pas vraiment de

sphéroïdes, même après 4 jours d'incubation, moment où elles commencent à sembler mal en point. Par contre, les cellules MUC16-CTD utilisées ici pour but de comparaison forment des sphéroïdes très serrés dès le 3^{ème} jour d'incubation et les cellules semblent très bien tolérer cette situation même au jour 4. On observe exactement le même type de sphéroïdes se formant au même moment (jour 3) pour les cellules MUC16-UTM. Quant aux cellules MUC16-1RUTM, elles forment des sphéroïdes beaucoup moins serrés que les lignées MUC16-CTD et MUC16-UTM et au 4^{ème} jour d'incubation seulement. Elles montrent donc un phénotype considéré comme intermédiaire aux contrôles négatifs et aux populations stables MUC16-CTD et -UTM. Les conclusions que l'on peut tirer de ces résultats sont que le domaine unique (faisant partie du CTD) est suffisant pour permettre aux cellules de survivre dans le milieu de culture sans ancrage au plastique ou à de la matrice extracellulaire puisqu'on observe le même type de sphéroïdes pour les cellules MUC16-UTM et MUC16-CTD. Lorsqu'en plus du domaine unique on ajoute une répétition (MUC16-1RUTM), les cellules forment moins bien les sphéroïdes (plus tard et donnent des sphéroïdes plus lâches). Cela suggère alors des propriétés anti-adhésives au niveau des interactions cellule-cellule homotypiques lorsque qu'on ajoute des répétitions à la molécules CA125. À ce jour, rien n'est connu encore dans la littérature montrant un rôle répulsif des répétitions de CA125. Par contre, dans le cas de la mucine MUC1, il a été montré que lorsque l'on enlève le domaine des répétitions de la protéine, les cellules exprimant MUC1-ΔR ont des phénotypes plus invasifs et métastatiques que les cellules exprimant la molécule complète (KOHLGRAF et al., 2003). Vu d'une façon inverse, en ajoutant une répétition à CA125, les cellules ont moins tendance à former des sphéroïdes serrés et à vouloir former des interactions cellule-cellule. C'est ce qu'on observe avec les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM, c'est-à-dire que les cellules n'exprimant pas de répétition de CA125 (MUC16-UTM) forment plus

facilement des sphéroïdes que celles exprimant les mêmes domaines additionnés d'une répétition (MUC16-1RUTM). Au niveau moléculaire, E-cadhérine est connue pour être une molécule importante dans les interactions homotypiques (VLEMINCKX et al., 1999, STEINBERG et al., 1999), entre autres chez les sphéroïdes. Il en est de même pour les intégrines (ALBELDA et al. , 1990), particulièrement les β 1-intégrines (CASEY et al., 2001). Fait intéressant, dans notre modèle perte de fonction dans la lignée cellulaire OVCAR-3, des analyses de micropuces à ADN ont montré une diminution de l'expression et une localisation différente de E-cadhérine dans ces cellules (données non-publiées), qui ne forment pas de sphéroïdes ! L'analyse n'a pas encore été réalisée dans le cas des populations stables exprimant les domaines extracellulaires de CA125 chez les cellules SKOV3. Cependant, on pourrait supposer qu'on observerait une variation de l'expression ou une délocalisation de E-cadhérine dans ces cellules et que cette protéine pourrait être impliquées dans la formation de sphéroïdes par les cellules exprimant les différents domaines extracellulaires de CA125. En résumé, grâce à l'expérience de formation de sphéroïdes, nous pouvons conclure que les cellules MUC16-UTM sont plus tumorigéniques que les cellules MUC16-1RUTM, qui elles, le sont plus que les lignées contrôles SKOV3 et SKOV3-GFP.

Dans le même ordre d'idées, la formation de colonies en agar mou, un milieu semi-solide empêchant l'ancrage des cellules au plastique et à toute matrice extracellulaire, constitue aussi une mesure de la tumorigénicité des cellules. Après 30 jours de croissance dans ce milieu, les cellules disposées individuellement dans l'agar initialementensemencées ont donné des colonies de cellules. Qualitativement, la différence entre les lignées contrôles (SKOV3 et SKOV3-GFP) et les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM est frappante : les colonies sont beaucoup plus grosses pour les protéines exprimant les domaines

extracellulaires de CA125 à leur surface (figure 26 A). De plus, si l'on observe de plus près les colonies formées par les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM (photos à l'objectif 10X de la figure 26 A), on peut voir que celles des cellules MUC16-UTM montrent une bordure bien définie et les cellules semblent plus serrées les unes aux autres. Les colonies MUC16-1RUTM, de leur côté, semblent un peu plus lâches et ne montrent pas vraiment de bordure organisant la colonie en sphère comme les MUC16-UTM, suggérant que les interactions homotypiques des cellules MUC16-UTM sont plus fortes et plus importantes que celles faites par les cellules MUC16-1RUTM. Le décompte des colonies est également éloquent : il y a de 5 à 10 fois plus de colonies chez les populations stables MUC16-UTM et MUC16-1RUTM que chez les cellules contrôles. Encore une fois, on conclue de cet essai que les cellules MUC16-UTM sont un peu plus tumorigéniques que les cellules MUC16-1RUTM, et que ces deux dernières lignées sont plus tumorigéniques que les cellules contrôles puisqu'elles arrivent à croître beaucoup plus facilement en formant des interactions cellule-cellule homotypique en absence d'ancrage.

Les derniers points discutés en viennent à un consensus évident : les cellules exprimant à la membrane les domaines extracellulaires de CA125 sont plus tumorigéniques que les cellules contrôles, surtout dans le cas des cellules MUC16-UTM. Une expérience très pertinente pourra être réalisée éventuellement : l'injection de cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM chez des souris NUDE et SCID. Ces résultats permettraient de vérifier la tumorigénicité et peut-être même le potentiel métastatique des lignées cellulaires produites *in vivo*.

56. Les cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM ont un potentiel migratoire élevé

Jusqu'à maintenant, les phénotypes observés et discutés chez les cellules exprimant à leur surface les domaines extracellulaires de CA125 reflètent la tumorigénicité des populations stables nous servant de modèle d'étude de ces domaines. Connaissant donc leur potentiel tumorigénique, nous avons ensuite voulu explorer une autre caractéristique des cellules cancéreuses malignes, leur potentiel métastatique. Pour former des métastases, les cellules cancéreuses doivent pouvoir migrer vers des points secondaires. Un premier essai, quoique demeurant qualitatif, permet de déterminer le potentiel migratoire des cellules : un essai de migration par blessure de la monocouche. Une fois la blessure tracée dans la monocouche et la prolifération bloquée afin de n'observer que la migration des cellules, des photos ont été prises après 6 et 24 heures d'incubation. Il faut d'abord savoir que la lignée cellulaire SKOV3 est une lignée de cellules assez agressives et qu'elles ont un certain potentiel migratoire de base. Le but de ce test était donc de vérifier s'il existait une différence entre nos modèles d'étude (MUC16-UTM et MUC16-1RUTM) et les cellules contrôles (parentale et SKOV3-GFP). Dès 6 heures d'incubation, on peut suggérer que les cellules exprimant les domaines extracellulaires de CA125 ont migré plus que les contrôles. Cela se confirme après 24 heures, où l'on peut voir que les cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM ont migré jusqu'à remplir pratiquement toute la blessure tandis que l'on peut voir que les cellules contrôles ont migré de façon beaucoup moins importante. La conclusion à tirer du résultat de cette expérience est donc qu'on augmente le potentiel migratoire des cellules SKOV3 lorsque l'on force l'expression des domaines unique et unique +1 répétition. Pour obtenir un résultat plus quantitatif, un autre essai mesurant la migration pourra être effectué sur ces cellules : la chambre de Boyden. Cet essai permettrait de compter les cellules capables de migrer à travers

une membrane poreuse. L'invasion peut également être mesurée par un essai similaire et révélerait un autre aspect du potentiel métastatique des cellules.

57. Comparaison des phénotypes des modèles d'étude de CA125

Le tableau 6 reprend les résultats des phénotypes observés des chez les différents modèles d'étude de CA125, soit la perte de fonction (knockdown), le gain de fonction de MUC16-CTD, MUC16-UTM et MUC16-1RUTM.

Tous les phénotypes de chacun des modèles semblent concorder pour dire que la tumorigénicité des cellules cancéreuses de l'ovaire (du moins pour les lignées OVCAR-3 et SKOV3) augmente lorsque les cellules expriment CA125. De plus, ces résultats révèlent que le CTD de la protéine ou même le domaine unique seul de CA125 est suffisant pour que les cellules acquièrent les caractéristiques de cellules très tumorigéniques. Au niveau de la migration cependant, on remarque que les cellules ayant perdu l'expression de surface de CA125 gagnent en potentiel migratoire de même que pour les modèles de gain de fonction. De prime abord, cela semble contradictoire. Cependant, lorsque l'on compare les morphologie des cellules, on s'aperçoit que les cellules CA125-knockdown, lorsqu'elles perdent l'expression de CA125, passent d'une morphologie épithéliale à une morphologie mésenchymateuse (EMT). Cette transition est accompagnée de la perte de molécules de surface typiques des cellules épithéliales au profit de celles des cellules mésenchymateuses (certaines données non-publiées sont connues à ce sujet dans le laboratoire). Les cellules mésenchymateuses sont aptes à migrer car elles n'expriment plus certaines molécules d'adhésion et forment des extensions qui favorisent leur migration.

Tableau 6 : Comparaison des phénotypes observés chez les modèles d'études de CA125 du laboratoire. (Données non-publiées)

Phénotype observé	Modèle perte de fonction (knockdown)	Modèle gain de fonction (MUC16-CTD)	Modèle gain de fonction (MUC16-UTM)	Modèle gain de fonction (MUC16-1RUTM)
Temps de doublement	Aucun effet	Aucun effet	Aucun effet	Aucun effet
Sensibilité à l'inhibition de contact	↑	↓	↓	↓
Croissance en absence d'ancrage (milieu semi-solide)	↓	↑	↑ ↑	↑
Formation de foyers post-confluence	↓	↑	↑	↑
Formation de sphéroïdes	↓ ↓	↑ ↑	↑ ↑	↑
Formation de tumeurs chez souris NUDE et SCID	Non	Oui	?	?
Morphologie cellulaire	Épithéliale ↓ Mésenchymateuse	Mésenchymateuse ↓ Mésenchymateuse	Mésenchymateuse ↓ Mésenchymateuse	Mésenchymateuse ↓ Mésenchymateuse
Migration	↑	↑	↑	↑

Tous ces résultats obtenus avec les différents modèles peuvent être corrélés avec certaines données cliniques suscitant nombre de questionnements chez les différents groupes intéressés à CA125 dans le cancer épithélial de l'ovaire. Rappelons que l'étude MALOVA a montré que 50% des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire en stade précoce présentent une élévation de la concentration sérique de CA125 et que CA125 est détectable à la surface tumorale chez

50% des tumeurs de stade I (HOGDALL et al., 2007). Par contre, chez les stades avancés, plus de 80-95 % des patientes montrent des concentrations sériques de CA125 élevées (> 35 U/mL) alors qu'on observe une perte de CA125 à la surface de la tumeur même si CA125 est surexprimé (HOGDALL et al., 2007; BERCHUCK et al., 1989; SAWIRIS et al., 2002). Les patientes en stades avancés qui montrent des tumeurs CA125-négatives survivent significativement moins longtemps que les patientes aux tumeurs CA125-positives (HOGDALL et al., 2007). Il ne faut pas oublier que les seuls anticorps anti-CA125 existants pour le moment et qui sont utilisés en clinique sont dirigés contre les épitopes situés dans le domaine des répétitions en tandem de la protéine. Ces données peuvent sembler difficiles à interpréter, mais les modèles que nous étudions au laboratoire permettent de poser des hypothèses pour répondre à tous ces questionnements. En effet, considérant que les cellules MUC16-CTD et MUC16-UTM sont les plus tumorigéniques et corrélant cela au fait que chez les patientes de cancer ovarien en stades avancés, CA125 à la surface des cellules tumorales est indétectable et que ces patientes ont une survie plus courte, notre hypothèse est que CA125 est clivé près du domaine unique. CA125 est ainsi relâché et peut être détecté au niveau sérique et devient indétectable à la surface tumorale dû à l'absence de répétitions de CA125. Selon la structure de CA125, un clivage est probable aux domaines SEA ou encore au site de clivage protéolytique potentiel juxtamembranaire. D'autres constructions seraient alors importantes à faire. Par exemple, l'étude de l'effet de la queue cytoplasmique sur la tumorigénicité pourrait être étudiée avec une population stable exprimant ce domaine ancré à la membrane plasmique (en cours de réalisation).

La fabrication d'anticorps reconnaissant d'autres domaines de CA125 (unique et cytoplasmique) devient aussi de plus en plus pertinente pour l'étude du clivage de CA125 afin de vérifier nos hypothèses.

58. Modèle proposé

Rassemblant toutes les conclusions tirées des résultats obtenus dans ce projet, un modèle peut ainsi être proposé. À des stades avancés du cancer épithélial de l'ovaire, CA125 est clivé dans la région du domaine unique et n'est donc plus détectable à la surface des cellules tumorales et le reste de la protéine est alors détectable dans le sang et l'ascite de la patiente. Les cellules exprimant le CTD ou encore exprimant les domaines unique + 1 ou quelques répétitions sont à ce moment très tumorigéniques et ont acquis un potentiel métastatique important. Les cellules cancéreuses se détachent de la tumeur primaire et se retrouvent dans la cavité péritonéale pour aller s'implanter à des sites secondaires. Dans ce microenvironnement, CA125 protège les cellules cancéreuses de la lyse par les cellules NK en s'y liant via un récepteur KIR, selon une hypothèse que nous pourrions émettre. CA125 clivé présent dans l'ascite et le sang lie aussi la surface des cellules NK et modifie leurs caractéristiques. De plus, CA125 favorise l'attachement des cellules cancéreuses aux cellules mésothéliales bordant la cavité intrapéritonéale via son domaine des répétitions, favorisant également la métastase des cellules cancéreuses de l'ovaire.

59. Conclusions et perspectives

Plus de 25 ans ont passés depuis la découverte du marqueur de cancer ovarien CA125. Toutes ces années ont certes permis d'en apprendre un peu plus sur sa séquence et sa structure. Une structure et certaines fonctions de CA125 ont été proposées en ayant comme modèles d'autres mucines. Cependant, les rôles exacts de cette gigantesque mucine demeurent encore à ce jour inconnus et méritent d'être étudiés. En effet, le cancer ovarien est le cancer gynécologique le plus létal. On sait également que les niveaux d'expression de CA125 corréleront avec la progression ou la régression de la tumeur et que CA125 pourrait avoir des rôles dans le développement du cancer de l'ovaire.

Ce projet consistait donc à vérifier l'effet de la présence de CA125 à la surface cellulaire dans les interactions hétérotypiques des cellules cancéreuses de l'ovaire avec son microenvironnement (le mésothélium par les cellules mésothéliales et le système immunitaire dans l'ascite par les cellules NK) et l'effet de l'expression de domaines extracellulaires de CA125 de façon membranaire sur les différentes caractéristiques des cellules cancéreuses, soit la tumorigénicité et le potentiel métastatique. Par les essais réalisés avec CA125 purifié de milieu conditionné de cellules l'exprimant fortement, CA125 purifié d'ascite de patientes de cancer ovarien et des cellules CA125-knockdown, nous avons déterminé que CA125 soluble (i.e. libre dans le milieu extracellulaire) se lie à la surface des lymphocytes. CA125 offrirait aussi un rôle protecteur des cellules cancéreuses de l'ovaire contre la lyse par les cellules NK. Toujours au niveau des interactions hétérotypiques, nous avons contribué à montrer que les cellules cancéreuses de l'ovaire exprimant CA125 liaient les cellules mésothéliales par une interaction CA125 / mésothéline, interaction connue pour se faire via le

domaine des répétitions en tandem de CA125. Des populations stables sécrétant les domaines extracellulaires de CA125 (domaine unique, 1 répétition, 2 répétitions) ont été produites afin de poursuivre et approfondir les connaissances sur ces interactions. D'autres populations stables ont été produites dans une lignée cellulaire n'exprimant pas CA125 de façon endogène et constituant donc un gain de fonction. Nous avons forcé l'expression des unique (MUC16-UTM) et unique + 1 répétition (MUC16-1RUTM) à la membrane cellulaire. Ces lignées cellulaires ont servi à montrer que ces domaines confèrent aux cellules un caractère tumorigénique. En effet, les cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM ont le même temps de doublement et la même clonogénicité que les cellules n'exprimant pas ces domaines, mais ont une diminution marquée de la sensibilité à l'inhibition de contact (forment plus de foyers post-confluence et atteignent plus tard leur phase plateau de la courbe de croissance). Ces mêmes cellules forment également plus d'agrégaions cellulaires en absence d'ancrage, nous informant qu'elles sont donc plus tumorigéniques car elles sont moins sensibles à l'anoïkose. Pour ce qui est du potentiel métastatique des cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM, un seul essai qualitatif a été réalisé, la migration par blessure de la monocouche, et a montré que ces cellules migrent plus que les cellules contrôles. Ceci suggère donc que les domaines unique et des répétitions de CA125 ont un rôle à jouer dans la métastase des cellules cancéreuses et que le domaine unique est suffisant pour leur attribuer ce rôle.

En perspectives, plusieurs choses restent à être confirmées ou élucidées. D'abord, les interactions hétérotypiques des cellules cancéreuses de l'ovaire avec les cellules mésothéliales pourront être approfondies grâce aux domaines sécrétés de CA125 (études en cours chez notre collaborateur, Dr Patankar); par exemple, on étudiera l'interaction CA125 via les répétitions et mésothéline soit par les deux molécules à leur surface cellulaire

respective ou encore la mésothéline exprimée à la surface des deux types cellulaires liant les répétitions du CA125 sécrété ou clivé dans le milieu extracellulaire. Grâce à ces mêmes modèles d'études (les différentes portions du domaine extracellulaire de CA125 sécrété dans le milieu de culture), les interactions hétérotypiques des cellules cancéreuses de l'ovaire avec les cellules lymphocytaires pourront aussi être étudiées. En effet, on peut soupçonner une interaction entre ces domaines de CA125 et un récepteur KIR à la surface lymphocytaire ou encore à la galectine-1 ayant elle-même la capacité de se lier à la surface lymphocytaire. La tumorigénicité associée aux cellules MUC16-UTM et MUC16-1RUTM pourra être vérifiée *in vivo* par l'injection de ces cellules à des souris. Au niveau du potentiel métastatique de ces cellules, seul un essai préliminaire a été réalisé et d'autres essais plus quantitatifs tels que la migration et l'invasion par chambre de Boyden pourront être effectués. Un peu plus à long terme, des constructions du domaines N-terminal de CA125 dont la séquence n'est pas encore déterminée avec certitude pourront être fabriquées et utilisées pour déterminer les rôles de cette portion du domaine extracellulaire. De plus, des anticorps dirigés contre le domaine unique de CA125 pourront être produits et permettront l'étude du clivage du domaine extracellulaire de CA125 près de la membrane cellulaire.

En somme, l'objectif principal de ce projet a été atteint, c'est-à-dire que nous pouvons maintenant proposer des rôles des domaines unique et des répétitions (domaines extracellulaires) de CA125. Les outils produits serviront à poursuivre l'étude des fonctions du marqueur de cancer ovarien CA125.

REMERCIEMENTS

J'adresse mon premier remerciement à ma directrice de recherche, Dre Claudine Rancourt, d'abord pour avoir cru en moi en me confiant un projet dans son laboratoire. Merci aussi pour les connaissances, conseils et enthousiasme qu'elle a su me transmettre durant mon passage au laboratoire.

J'aimerais remercier également Dr Manish Patankar, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire durant trois mois afin d'échanger des expertises et connaissances. La collaboration étroite qui suivit ces quelques mois m'a énormément apporté.

Merci au Dr Alain Piché pour avoir apporté son opinion et ses suggestions menant à des discussions intéressantes face à mon projet de recherche.

Plusieurs personnes m'ont aussi apporté de l'aide au cours de ma maîtrise : les équipes des laboratoires de Dr François Boudreau et Dre Nicole Gallo-Payet. Je les remercie sincèrement.

Mes remerciements se dirigent aussi vers les assistants de recherche et techniciens du laboratoire, spécialement à Denis Lane et Isabelle Matte pour toute l'aide, les réponses aux questionnements et le support qu'ils m'ont apportés.

Un immense merci aux étudiants passés et présents du laboratoire avec qui j'ai eu énormément de plaisir à travailler et qui m'ont tous aidé à leur façon durant ma maîtrise.

Finalement, je désire remercier mes proches pour leur soutien tout au long de mes études graduées. D'abord, mon amoureux Carl pour m'avoir encouragé sans relâche malgré les difficultés rencontrées et sans qui il aurait été difficile de réaliser mes projets d'études. Ce

n'est pas toujours facile à vivre une étudiante graduée ! Merci à mes parents et ma famille qui ont grandement contribué à faire de mes études une réussite par leurs encouragements et leur soutien.

Merci.

RÉFÉRENCES

- Ahmed N, Oliva KT, Barker G, Hoffmann P, Reeve S, Smith IA, Quinn MA, Rice GE. Proteomic tracking of serum protein isoforms as screening biomarkers in ovarian cancer. *Proteomics*, 5(17), p. 4625-4636, 2005.
- Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB Journal*, 4, p. 2868-2879, 1990.
- Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression : Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1765 (2), p. 189-222, 2006.
- Auesperg N, Edelson MI, Mok SC, Johnson SW, Hamilton TC. The biology of ovarian cancer. *Seminars in Oncology*. 25, p. 281-304, 1998.
- Auesperg N, Wong AST, Choi K, Kang SK, Leung PCK. Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology, *Endocrine reviews*, 22(2), p. 255-288, 2001.
- Barbati A, Broccucci L, Anceschi MM, Cosmi EV. Regulation of CA 125 production by amnion and WISH cells in culture. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 164 (5 Pt 1), p. 1355-1359, 1991.
- Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *Journal of Clinical Investigation*. 68(5), p. 1331-1337, 1981.
- Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR Jr, Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 309(15), p. 883-887, 1983.
- Bast RCJ, XU FJ, YU YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA125: The past and the future. *The International Journal of Biologicals Markers*, 13 (4) p. 179-187, 1998.
- Beaudin J. Anticorps monovalents modifies anti-CA125: Nouveaux inhibiteurs de l'antigène tumoral CA125. Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de Microbiologie et Infectiologie. Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé. 142 pages. Juin 2003.
- Beck EP, Moldenhauer A, Merkle E, Kiesewetter F, Jäger W, Wildt L, Lang N. CA 125 production and release by ovarian cancer cells *in vitro*. *The International Journal of Biological Markers*, 13 (4) p. 200-206, 1998.

- Belisle JA, Gubbels JAA, Raphael CA, Migneault M, Rancourt C, Connor JP, Patankar MS. Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125). *Immunology*, 122(3), p.418-429, 2007.
- Bellacosa A de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, Ferrandina G, Pacini PB, Mancuso S, Neri G, Testa JR. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *International Journal of Cancer*, 64, p. 280-285, 1995.
- Berchuck A, Soisson AP, Clarke-Pearson DL, Soper JT, Boyer CM, Kinney RB, McCarty KSJ, Bast RCJ. Immunohistochemical expression of CA 125 in endometrial adenocarcinoma: correlation of antigen expression with metastatic potential. *Cancer Research*, 49, p. 2091-2095, 1989.
- Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-Pearson DL, Marks P, McKenzie S, Bast Jr RC. Overexpression of Her2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Research*, 50, p. 4087-4091, 1990.
- Berchuck A, Kohler MF, Marks JR, Wiseman R, Boyd J, Bast Jr RC. The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 170, p. 246-252, 1994.
- Boivin M. Implication de CA125 (MUC16) dans la sensibilité des cellules de cancer de l'ovaire aux agents génotoxiques. Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de Microbiologie et Infectiologie. Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé. 146 pages. Juin 2005.
- Borgono CA, Kishi T, Scorilas A, Harbeck N, Dorn J, Schmalfeldt B, Schmitt M, Diamandis EP. Human kallikrein 8 protein is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Clinical cancer research*, 12 (5), p. 1487-1493, 2006.
- Brown MR, Masiero L, Kohn EC. Principles and practice of gynecologic oncology - Tumor angiogenesis and metastasis, 3ème edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphie, p.87-102, 2000.
- Burleson KM, Casey RC, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR Jr, Skubitz APN. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecologic Oncology*, 93, p. 170-181, 2004.
- Casey RC, Burleson KM, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR Jr, Ruff LE, Skubitz APN. B1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *American Journal of Pathology*, 159(6), p. 2071-2080, 2001.

Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas and ovarian cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, p.136-140, 1996.

Cooper GM. *The Cell – A molecular approach*. 2ème édition. Boston University. Massachusetts. 2000.

Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis, *Journal of the National Cancer Institute*, 71(4), p. 717-721, 1983.

Danguy A, Camby I, Kiss R. Galectins and cancer. [Review] *Biochimica et Biophysica Acta*. 1572 (2-3), p. 285-293, 2002.

Davis HM, Zurawski VR Jr, Bast RC Jr, Klug TL. Characterization of the CA 125 antigen associated with human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Research*, 46 (12 Pt 1), p. 6143-6148, 1986.

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: Principles and practices of oncology*, 5ème édition, Lippincott-Raven, Philadelphie, 1997.

Didier C, Broday L, Bhoumik A, Israeli S, Takahashi S, Nakayama K, Thomas SM, Turner CE, Henderson S, Sabe H, Ronai Z. RNF5, a RING finger protein that regulates cell motility by targeting paxillin ubiquitination and altered localization. *Molecular & Cellular Biology*, 23 (15), p. 5331-45, 2003.

Duraisamy S, Ramasamy S, Kharbanda S, Kufe D. Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16. *Gene*, 373, p. 28-34, 2006.

Enomoto T, Weghorst CM, Inoue M, Tanizawa O, Rice JM. K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in others common epithelial tumors of the human ovary. *American Journal of Pathology*. 139, p. 777-785, 1991.

Fathalla MF. Incessant ovulation – a factor in ovarian neoplasia ?, *Lancet.*, 2(7716), p. 163, 1971.

Fendrick JL, Konishi I, Geary SM, Parmley TH, Quirk JG, O'Brien TJ. CA125 phosphorylation is associated with its secretion from the WISH human amnion cell line. *Tumor Biology*, 18, p.278-289, 1997.

Grimwood J, Gordon LA, Olsen A, Terry A, Schmutz J, Lamerdin J, Hellsten U, Goodstein D, Couronne O, Tran-Gyamfi M, Aerts A, Altherr M, Ashworth L, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caenepeel S, Carrano A, Caoile C, Chan YM, Christensen M, Cleland CA, Copeland A, Dalin E, Dehal P, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Garcia C, Georgescu AM, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Ho I, Huang W, Israni S, Jett J, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Larionov V, Leem SH, Lopez F, Lou Y, Lowry S, Malfatti S, Martinez D, McCready P, Medina C, Morgan J, Nelson K, Nolan M, Ovcharenko I,

Pitluck S, Pollard M, Popkie AP, Predki P, Quan G, Ramirez L, Rash S, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salamov A, Salazar A, She X, Smith D, Slezak T, Solovyev V, Thayer N, Tice H, Tsai M, Ustaszewska A, Vo N, Wagner M, Wheeler J, Wu K, Xie G, Yang J, Dubchak I, Furey TS, DeJong P, Dickson M, Gordon D, Eichler EE, Pennacchio LA, Richardson P, Stubbs L, Rokhsar DS, Myers RM, Rubin EM, Lucas SM. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature*. 428 (6982), p. 529-535, 2004.

Gubbels JAA, Belisle JA, Onda M, Rancourt C, Migneault M, Ho M, Bera TK, Connor J, Sathyanarayana BK, Lee B, Pastan I, Patankar MS. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Molecular Cancer* 5(1), p. 50-65, 2006.

Guppy AE, Rustin GJS. CA125 Response: Can it replace the traditional response criteria in ovarian cancer ? *The Oncologist*, 7, p. 437-443, 2002.

Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, p. 57-70, 2000.

Hardardottir H, Parmley TH, Quirk JG, Sanders MM, Miller FC, O'Brien TJ. Distribution of CA125 in embryonic tissue and adult derivatives of the fetal periderm. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 163(6), p. 1925-1931, 1990.

Hassan R, Bera T, Pastan I. Mesothelin : a new target for immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 10, p. 3937-3942, 2004.

Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, Zhang J, Cox DD, Pingpank J, Alexander R, Willingham M, Pastan I, Onda M. Detection et quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesotheliomas and ovarian cancer. *Cinical cancer research*, 12(2), p. 447-453, 2006.

Hogdall EVS, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Kjaerbye-Thygesen A, Gayther S, Jacobs IJ, Hogdall CK. CA125 espression pattern, prognosis and correlation with serum CA125 in ovarian tumor patients from the Danish "MALOVA" Ovarian Cancer Study. *Gynecologic Oncology*, 104, p. 508-515, 2007. Éditorial CA125: Megadaltons of novel opportunities, p. 505-507.

Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer : protection and control of the cell surface. *Nature Reviews Cancer*, 4, p. 45-60, 2004.

Hovig E, Rye PD, Warren DJ, Nustad K. CA 125: the end of the beginning Tumor Biology., 22 (6), p. 345-347, 2001.

Hugues RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochemical Society Transactions*, 25, p. 1194-1198, 1997.

Kabawat SE, Bast RC, Welch WR, Knapp RC, Colvin RB. Immunopathologic characterization of a monoclonal antibody that recognizes common surface antigens of human ovarian tumors of serous, endometrioid, and clear cell types. *American Journal of Clinical Pathology*. 79 (1), p.98-104, 1983.

Kacinski BM, Carter D, Kohorn EI, Mittal K, Bloodgood RS, Donahue J, Kramer CA, Fischer D, Edwards R, Chambers SK, Chambers, JT, Schwartz PE. Oncogene expression *in vivo* by ovarian adenocarcinomas and mixed-mullerian tumors. *Yale Journal of Biological Medicine*, 62, p. 379-392, 1989.

Kaneko SJ, Gerasimova T, Smith ST, Lloyd KO, Suzumori K, Young SR. CA125 and UQCRFS1 FISH studies of ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*. 90 (1), p. 29-36, 2003.

Khatri IA, Wang R, Forstner JF. SEA (sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin)-module cleavage, association of fragments and membrane targeting of rat intestinal mucin Muc3. *The Biochemical Journal*, 372 (Pt 1), p. 263-270, 2003.

Kohler M, Janz I, Wintzer HO, Wagner E, Bauknecht T. The expression of EGF receptors, EGF-like factors and c-myc in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance. *Anticancer Research*, 9, p. 1537-1547, 1989.

Kohlgraf KG, Gawron AJ, Higashi M, Meza JL, Burdick MD, Kitajima S, Kelly, DL, Caffrey TC, Hollingworth MA. Contribution of the MUC1 Tandem Repeat and Cytoplasmic Tail and Metastatic Properties of a Pancreatic Cell Line. *Cancer Research*, 63, p. 5011-5020, 2003.

Konishi I, Fendrick JL, Parmley TH, Quirk JG Jr, O'Brien TJ. Epidermal growth factor enhances secretion of the ovarian tumor-associated cancer antigen CA125 from the human amnion WISH cell line. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 1 (1), p. 89-96, 1994.

Kurachi H, Adahi H, Morishige KI et al., Transforming growth factor- α promotes tumor markers secretion from human ovarian cancers in vitro. *Cancer*, 78, p. 1049-1054, 1996.

Levitin F, Stern O, Weiss M, Gil-Henn C, Ziv R, Prokocimer Z, Smorodinsky NI, Rubinstein DB, Wreschner DH. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (39), p. 33374-33386, 2005.

Lloyd KO, Yin BW, Kudryashov V. Isolation and characterization of ovarian cancer antigen CA 125 using a new monoclonal antibody (VK-8): identification as a mucin-type molecule. *International Journal of Cancer*, 71 (5), p.842-850, 1997.

Maeda T, Inoue M, Koshiba S, Yabuki T, Aoki M, Nunokawa E, Seki E, Matsuda T, Motoda Y, Kobayashi A, Hiroyasu F, Shirouzu M, Terada T, Hayami N, Ishizuka Y, Shinya N, Tatsuguchi A, Yoshida M, Hirota H, Matsuo Y, Tani K, Arakawa T, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Kigawa T, Yokoyama S. Solution structure of the SEA domain from the murine homologue of ovarian cancer antigen CA125 (MUC16). *Journal of Biological Chemistry*, 279 (13), p. 13174-13182, 2004.

Markman M. The role of CA-125 in the management of ovarian cancer. *The Oncologist*, 2, p. 6-9, 1997.

Marth C, Fuith LC, Böck G, Daxenbichler G, Dapunt O. Modulation of Ovarian Carcinoma Tumor Marker CA-125 by γ -Interferon. *Cancer Research*, 49, p. 6538-6542, 1989.

Marth C, Lang T, Koza A, Mayer I, Daxenbichler G. Transforming growth factor-beta (TGF- β) and ovarian carcinoma cells : regulation of proliferation and surface antigen expression. *Cancer Letters*, 51, p. 221-225, 1990.

Marth C, Zeimet AG, Widschwendter M, Daxenbichler G. Regulation of CA125 expression in cultured human carcinoma cells. *The International Journal of Biological Markers*, 13 (4), p.207-209, 1998.

Martin VR. Ovarian cancer. *Seminars in Oncology Nursing*, 18 (3), p. 174-183, 2002.

Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, Roy JA, Goodman MD, Misra UK, Cheek DJ, Pizzo SV. Endothelial cell surface F_1 - F_0 ATP synthase is active in ATP synthesis and inhibited by angiostatin. *PNAS*, 98 (12), p. 6656-6661, 2001.

Nagata A, Hirota N, Sakai T, Fujimoto M, Komoda T. Molecular nature and possible presence of a membranous glycan-phosphatidylinositol anchor of CA125 antigen. *Tumor Biology*, 12 (5), p. 279-286, 1991.

Ness RB, Cottreau C. Possible role of epithelial inflammation in ovarian cancer. *Journal of National Cancer Institute* 91, p. 1459-1467, 1999.

Ness RB, Cramer DW, Goodman MT, Kjaer SK, Mallin K, Mosgaard BJ, Purdie DM, Risch HA, Vergona R, Wu AH. Infertility, Fertility Drugs, and Ovarian Cancer: A Pooled Analysis of Case-Control Studies. *American Journal of Epidemiology*. 155 (3), p. 217-224, 2002.

Nowell PC. Mechanisms in tumor progression. *Cancer research*, 46, p. 2203-2207, 1986.

Nustad K, Bast RC Jr, Brien TJ, Nilsson O, Seguin P, Suresh MR, Saga T, Nozawa S, Bormer OP, de Bruijn HW, Nap M, Vitali A, Gadnell M, Clark J, Shigemasa K, Karlsson B, Kreutz FT, Jette D, Sakahara H, Endo K, Paus E, Warren D, Hammarstrom S, Kenemans P, Hilgers J. Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: first report from the ISOBM TD-1 workshop. International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. *Tumour Biology*. 17 (4), p. 196-219, 1996.

Obata K, Morland SJ, Watson RH, Hitchcock A, Chenevix-Trench G, Thomas EJ, Campbell IG. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Research*, 58, p. 2095-2097, 1998.

Oberst MD, Johnson MD, Dickson RB, Lin CY, Singh B, Stewart M, Williams A, al-Nafussi A, Smyth JF, Gabra H, Sellar GC. Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with the clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clinical cancer research*, 8(4), p. 1101-1107, 2002.

O'Brien TJ, Hardin JW, Bannon GA, Norris JS, Quirk JG. CA125 antigen in human amniotic fluid and fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 155, p.50-55, 1986.

O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Dennis RA, Santin AD, York L. The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumor Biology*, 22 (6), p. 348-366, 2001.

O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Shigemasa K. The CA 125 gene: a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure. *Tumor Biology*, 23 (3), p. 154-169, 2002.

Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, Daly MB, Godwin AK, Schilder RJ, Xu X, Hamilton TC. Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell*. 5(1):19-24, 2004.

Palmai-Pallag T, Khodabukus N, Kinarsky L, Leir SH, Sherman S, Hollingsworth MA, Harris A. The role of the SEA (sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin) module in cleavage of membrane-tethered mucins. *FEBS Journal*, 272, p. 2901-2911, 2005.

Parazzini F, Negri E, La Vecchia C, Moroni S, Franceschi S, Crosignani PG. Treatment for infertility and risk of invasive epithelial ovarian cancer. *Human Reproduction*. 12 (10), p. 2159-2161, 1997.

Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *Journal of Molecular Medicine*. 76 (6), p. 402-412, 1998.

Pinard M. CA125, un régulateur négatif du potentiel invasif des cellules cancéreuses de l'ovaire? Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de Microbiologie et Infectiologie. Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé. Août 2005.

Rieppi M, Vergani, V, Gatto C, Zanetta G, Allavena P, Taraboletti G, Giavazzi R. Mesothelial cells induce the motility of human ovarian carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, 80, p. 303-307, 1999.

Ruiz P, Günthert U. The cellular basis of metastasis. *World Journal of Urology*, 14, p. 141-150, 1996.

Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Minami S, Umesaki N, Takeuchi M, Miyajima A. Bonding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 279, p. 9190-9198, 2004.

Said NA, Najwer I, Socha MJ, Fulton DJ, Mok SC, Motamed K. SPARC inhibits LPA-mediated mesothelial-ovarian cancer cell crosstalk. *Neoplasia*, 9 (1), p. 23-35, 2007.

Sambrook J. Russel DW. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 3e edition. CSHL Press. NY. 2001.

Sawiris GP, Sherman-Baust CA, Becker KG, Cheadle C, Teichberg D, Morin PJ. Development of a Highly Specialized cDNA Array for the Study and Diagnosis of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 62, p. 2923–2928, 2002.

Scholler N, Crawford M, Sato A, Drescher CW, O'Briant KC, Kiviat N, Anderson GL, Urban N. Bead-based ELISA for validation of ovarian cancer early detection markers. *Clinical cancer research*, 12(7 pt 1), p. 2117-2124, 2006.

Schroeder JA, Adriance MC, Thompson MC, Camenisch TD, Gendler SJ. MUC1 alters beta-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion. *Oncogene*, 22 (9), p. 1324-1332, 2003.

Seelenmeyer C. Wegehinkel S. Lechner J. Nickel W. The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for galectin-1. *Journal of Cell Science*. 116 (Pt 7), p. 1305-1318, 2003.

Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW. PI3KCA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *National Genetics*, 21, p. 99-102, 1999.

Schummer M. Ng WV. Bumgarner RE. Nelson PS. Schummer B. Bednarski DW. Hassell L. Baldwin RL. Karlan BY. Hood L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene*. 238(2):375-85, 1999.

Singh AP, Moniaux N, Chauhan SC, Meza JL, Batra SK. Inhibition of MUC4 Expression Suppresses Pancreatic Tumor Cell Growth and Meastasis, *Cancer Research*, 64, p. 622-630, 2004.

Steinberg MS, McNutt PM. Cadherins and their connections : adhesion junctions have broader functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 11, p.554-560, 1999.

Tashiro H, Miyazaki K, Okamura H, Iwai A, Fukumoto M. c-myc overexpression in human primary ovarian tumours: its relevance to tumour progression. *International Journal of Cancer*. 50, p. 828-833, 1992.

Vleminckx K, Kemler R. Cadherins and tissue formation : integrating adhesion and signalling. *Bioessays*, 21, p. 211-220, 1999.

Voet D et Voet JG. Biochimie. Traduction de la 2ème édition américaine. DeBoeck Université. Paris, 1998.

Whitehouse C. Solomon E. Current status of the molecular characterization of the ovarian cancer antigen CA125 and implications for its use in clinical screening. *Gynecologic Oncology*. 88 (1 Pt 2) : S152-7, 2003.

Wilder JL, Pavlik E, Straughn JM, Kirby T, Higgins RV, DePriest PD, Ueland FR, Kryscio RJ, Whitley RJ, van Nagell J. Clinical implications of a rising serum Ca-125 within the normal range in patients with epithelial ovarian cancer: a preliminary investigation. *Gynecologic Oncology*, 89, p. 233-235, 2003.

Williams TI, Toups KL, Saggese DA, Kalli KR, Clibby WA, Muddiman DC. Epithelial ovarian cancer: disease etiology, treatment, detection, and investigational gene, metabolite, and protein biomarkers. *Journal of proteome research*. Review. 6. p. 2936-2962, 2007.

Wong NK, Easton RL, Panico M, Sutton-Smith M, Morrison JC, Lattanzio FA, Morris HR, Clark GF, Dell A, Patankar MS. Characterization of the Oligosaccharides Associated with the Human Ovarian Tumor Marker CA125. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (31), p. 28619-28634, 2003.

Yamaguchi N, Yamamura Y, Konishi E, Ueda K, Kojima T, Hattori K, Oheda M, Imai N, Taniguchi Y, Tamura M, Ochi N. Characterization, molecular cloning and expression of megakaryocyte potentiating factor. *Stem cells*, 14 (Suppl 1), p. 62-74, 1996.

Yin BWT et Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen – Identification as a new mucin MUC16. *the Journal of Biological Chenistry*, 276 (9), p. 27371-27375, 2001.

Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, Cocco L, Vitale M. NK cells and cancer. The Journal of Immunology, 178, p. 4011-4016, 2007.

Zurawski VR, Davis HM, Finkler NJ, Harrison CL, Bast RC, Knapp RC. Tissue distribution and characteristics of the CA125 antigen. Cancer Reviews. 11-12, p. 102-108, 1988.

Sites Internet :

Medline Plus, Rita Nanda, M.D., Department of Medicine, Section of Hematology/Oncology, University of Chicago Medical Center, Chicago, IL
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/9627.htm>

www.inpr.fr

<http://kugi.kribb.re.kr/KUGI/doc/pME18S-FL3/>